

ELISETE GUIMARÃES

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ESPECTROSCÓPICA E POR
ANÁLISE TÉRMICA DE ÁCIDOS HÚMICOS E VERMICOMPOSTOS
OBTIDOS DE ESTERCOS DE DIFERENTES ANIMAIS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Química do Departamento de
Química da Universidade Federal do Paraná
para obtenção do grau de mestre em Química -
área de concentração Química Inorgânica

ORIENTADOR

Doutor Antônio Sálvio Mangrich
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Exatas
Departamento de Química


CURITIBA

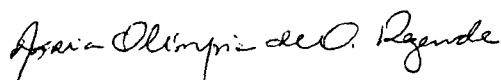
1997


PARECER

Nós, abaixo assinados, membros da Comissão Examinadora da defesa de Tese de Mestrado da aluna Elisete Guimarães avaliamos o trabalho, intitulado **Caracterização química, espectroscópica e por análise térmica de ácidos húmicos e vermicompostos obtidos de esterco de diferentes animais**, cuja defesa pública foi realizada no dia 27 de novembro de 1997. Após avaliação, decidimos pela **aprovação** da candidata com conceito **A**.

Curitiba, 27 de novembro de 1997.


Prof. Dr. Antonio Sálvio Mangrich
Deptº de Química - UFPR


Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Resende
Inst. de Química - USP São Carlos

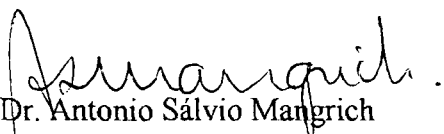

Profa. Dra. Sueli Maria Drechesel Erthal
Deptº de Química - UFPR

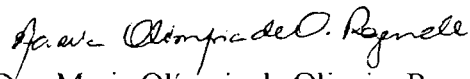



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

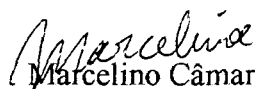
Ata da quarta Sessão Pública de
Defesa de Tese de Mestrado do
Curso de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal do Paraná,
realizada em 27/11/97.

Aos vinte e sete dias do mês de novembro do ano de um mil novecentos e noventa e sete, às quinze horas, na sala PQ13 do Departamento de Química da UFPR, foi realizada a sessão pública de defesa de Tese de Mestrado da aluna Elisete Guimarães. Estavam presentes, além da candidata, o Sr. Coordenador do Curso de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná e também Presidente da Comissão Examinadora Prof. Dr. Antonio Sálvio Mangrich, os demais membros da Comissão Examinadora, Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Resende e Profa. Dra. Sueli Maria Drechesel Erthal. Após apresentação do trabalho da candidata, intitulado **Caracterização química, espectroscópica e por análise térmica de ácidos húmicos e vermicompostos obtidos de esterco de diferentes animais**, a mesma foi argüida pela Comissão. A seguir a Comissão se reuniu em local reservado e decidiu, por unanimidade, pela aprovação da candidata, condicionada a alterações na tese sugeridas pela mesma. O resultado foi, então, comunicado à candidata e aos presentes na sessão pública. A seguir o Coordenador declarou encerrada a sessão da qual eu Marcelino Câmara, Secretário do Curso de Pós-Graduação em Química da UFPR, lavrei a presente Ata que, depois de aprovada será assinada por mim, pelo Presidente, e pelos demais membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. Antonio Sálvio Mangrich
Presidente
Deptº de Química - UFPR


Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Resende
Inst. de Química - USP São Carlos


Profa. Dra. Sueli Maria Drechesel Erthal
Deptº de Química - UFPR


Marcelino Câmara
Secretário PGDQ/UFPR

Não é o desafio com que nos deparamos
que determina quem somos e o que estamos nos tornando,
mas a maneira com que respondemos a este desafio.
Somos combatentes, idealistas, mas plenamente
conscientes.
Porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as
coisas;
só nos obriga a sermos conscientes.
Problemas para vencer, a liberdade para provar.
E, enquanto acreditamos no nosso sonho,
nada é por acaso.

HENFIL

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que contribuíram para a realização desta tese mas na impossibilidade de enumerar todas, gostaria, entretanto, de citar aquelas que, por uma razão ou outra, contribuíram mais significativamente.

Obrigada ao prof. Dr. Antônio Sálvio Mangrich, orientador de meu trabalho, cuja extraordinária competência nunca lhe diminui a compreensão para com as dificuldades da mestranda. Pelo constante apoio, pela valiosa e efetiva colaboração e pela sua grande amizade.

À prof^a– Dra. Maria Angeles Lobo, pela valiosa colaboração, pelos conselhos e também pela sua constante solicitude na etapa final deste trabalho.

À prof^a– Dra. Sueli Erthal, por ter me encaminhado ao orientador.

Ao prof. Dr. Fernando Wypych, pela colaboração na obtenção das análises térmicas.

Ao amigo Júlio Caetano Tomazoni, pela amizade e ajuda na digitação.

Obrigada aos muitos amigos do laboratório de RPE e Química Ambiental; Luís Carlos, Etelvino, Ademir, Marcus.

Ao Prof. Dinis, pela colaboração na interpretação dos espectros de RPE.

Ao Técnico Angelo, pelo auxílio na determinação do poder redutor.

Às amigas, Angelita Machado e Cláudia Regina Xavier, pelas conversas alegres durante o horário do almoço.

À amiga Lenise, pelo auxílio nas determinação dos grupos funcionais ácidos.

À funcionária Sônia Ferreira, por sua constante solicitude.

Ao biólogo Carlos Tanck, pelo auxílio técnico prestado na preparação do material para desenvolver a pesquisa.

Especialmente em relação ao meu trabalho, outros agradecimentos devo manifestar.

Obrigada à Universidade Federal do Paraná - Departamento de Química, pela acolhida.

Agradeço ao Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná (Unidade de Ensino de Pato Branco - CEFET/PR UNED-PB) pela liberação para que eu pudesse realizar o mestrado.

Ao laboratório de Análises da COPEL/LAC - Paraná, pelo auxílio técnico prestado na realização da Análise Elementar.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPR, pela obtenção dos espectros de Ressonância Magnética de Próton.

À Prof^a Edna Signorelli Toledo, pela determinação de metais. (Laboratório de Análises Ambientais do ISAM/ PUC-PR).

Agradeço ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de bolsa de estudo.

Um agradecimento especial à minha família, junto a eles restauro as forças da minha alma e encontro apoio e estímulo para prosseguir o meu caminho tendo a certeza de que nunca estarei sozinha.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VIII
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tratamento de detritos orgânicos - esterco de animais por minhocas (<i>Eisenia foetida</i>)..	10
1.1.2. <i>Eisenia foetida</i> (minhoca vermelha da califórnia).....	12
1.2. Fontes de micronutrientes.....	13
1.3. Princípios da teoria de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	16
1.3.1. Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	18
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Preparação dos vermicompostos	20
3.2 Extração de ácidos húmicos (AH)	21
3.2.1 Ressolubilização e reprecipitação de ácidos húmicos.....	22
3.3 Procedimentos Analíticos	24
3.3.1 Métodos Químicos	24
3.3.1.1 Análise elementar (C, H, N).....	24
3.3.1.2 Determinação de acidez total.....	24

3.3.1.3 Determinação de acidez carboxílica	26
3.3.1.4 Determinação de acidez fenólica	27
3.3.1.5 Determinação do poder redutor	28
3.3.2 Análise Térmica	30
3.3.3 Métodos Espectroscópicos	31
3.3.3.1 Espectroscopia de ultra violeta visível	31
3.3.3.2 Espectroscopia de Infravermelho (IVTF).....	31
3.3.3.3 Espectroscopia de ¹ H NMR	32
3.3.3.4 Espectrometria de Absorção Atômica (Análise de metais)	32
3.3.3.5 Espectroscopia de RPE	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Análise química elementar (C, H, N)	34
4.2 Espectroscopia eletrônica (UV-Vis)	37
4.3 Análise térmica (TG e DSC)	42
4.4 Determinação dos grupos ácidos (acidez total, COOH e ϕ -OH)	50
4.5 Determinação do poder redutor	52
4.6 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	59
4.7 Espectroscopia de ¹ H-RMN	64
4.8 Espectrometria de Absorção atômica	72
4.9- Espectroscopia de RPE	74
5. CONCLUSÕES	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Modelo de uma molécula de AH	7
Figura 2 Espectro de Ultra violeta visível de AH de Bovino	38
Figura 3 Espectro de Ultra violeta visível de VC de Bovino	38
Figura 4 Espectro de Ultra violeta visível de AH de Caprino.....	39
Figura 5 Espectro de Ultra violeta visível de VC de Caprino.....	39
Figura 6 Espectro de Ultra violeta visível de AH de Coelho	40
Figura 7 Espectro de Ultra violeta visível de VC de Coelho.....	40
Figura 8 Espectro de Ultra violeta visível de AH de Ovino.....	41
Figura 9 Espectro de Ultra violeta visível de VC Ovino	41
Figura 10 Termograma de AH Bovino	46
Figura 11 termograma de VC de Bovino	46
Figura 12 Termograma de AH de Caprino	47
Figura 13 Termograma de VC de Caprino	47
Figura 14 Termograma de AH de Coelho	48
Figura 15 termograma de VC de Coelho	48
Figura 16 Termograma de AH de Ovino	49
Figura 17 Termograma de VC de Ovino	49
Figura 18 Gráfico do poder redutor de AH de Bovino	55
Figura 19 Gráfico do poder redutor de VC de Bovino	55
Figura 20 Gráfico do poder redutor de AH de Caprino	56

Figura 21 Gráfico do poder redutor de VC de Caprino	56
Figura 22 Gráfico do poder redutor de AH de Coelho	57
Figura 23 Gráfico do poder redutor de VC de Coelho	57
Figura 24 Gráfico do poder redutor de AH de Ovino	58
Figura 25 Gráfico do poder redutor de VC de Ovino	58
Figura 26 Espectro de infravermelho de AH (sobreposto)	63
Figura 27 Espectro de Infravermelho de VC (sobreposto)	63
Figura 28 Espectro de ^1H -RMN AH Bovino	68
Figura 29 Espectro de ^1H -RMN AH Caprino	69
Figura 30 Espectro de ^1H -RMN AH Coelho	70
Figura 31 Espectro de ^1H -RMN AH Ovino	71
Figura 32 Espectro de RPE de AHBO	80
Figura 33 Espectro de RPE de AHBO (Detalhe das linhas de Cu e Mn)	80
Figura 34 Espectro de RPE de AHr-BO.....	81
Figura 35 Espectro de RPE de AHr-BO (Detalhe das linhas do Cu e Mn).....	81
Figura 36 Espectro de RPE de AHCA	82
Figura 37 Espectro de RPE de AHCA (Detalhe da linha do Cu).....	82
Figura 38 Espectro de RPE de AHr-CA.....	83
Figura39 Espectro de RPE de AHr-CA (Detalhe da linha do Cu).....	83
Figura 40 Espectro de RPE de AHr-CA (Experimental e simulado).....	84
Figura 41 Espectro de RPE de AHr-CA (super-hiperfinas do Cu-4N).....	84
Figura 42 Espectro de RPE de AHr-CA (Simulação Cu-4N e Cu- 4O)	85
Figura 43 Espectro de RPE de AHr-CA (Linha $g \sim 6,0$; Fe^{3+} - Porfirina)	85

Figura 44 Espectro de RPE de AHCO	86
Figura 45 Espectro de RPE de AHCO (Detalhe das linhas do Cu)	86
Figura 46 Espectro de RPE de AHr-CO.....	87
Figura 47 Espectro de RPE de AHr-CO (Detalhe das linhas de Cu e Mn)	87
Figura 48 Espectro de RPE de AHr-CO (Experimental e simulado)	88
Figura 49 Espectro de RPE de AHr-CO (Super- hiperfinas do Cu- 4N).....	88
Figura 50 Espectro de RPE de AHr-CO (simulação do Cu -4N e Cu-4O)	89
Figura 51 Espectro de RPE de AHr-CO (Linha $g \sim 6,0$; Fe ³⁺ -porfirina)	89
Figura 52 Espectro de RPE de AHOV	90
Figura 53 Espectro de RPE de AHr-OV.....	90
Figura 54 Espectro de RPE de AHr-OV (Detalhe das linhas de Cu e Mn).....	91
Figura 55 Espectro de RPE VCBO	91
Figura 56 Espectro de RPE VCCA	92
Figura 57 Espectro de RPE VCCO	92
Figura 58 Espectro de RPE de VCOV	93

Lista de Tabelas

Tabela 1: Condições para criação da <i>Eisenia Foetida</i> em resíduos de animais e vegetais	12
Tabela 2: Condições de preparo do vermicomposto com <i>Eisenia Foetida</i>	20
Tabela 3: Rendimento das frações da M.O.	21
Tabela 4: Dados obtidos nos experimentos na determinação do P.R	29
Tabela 5 Análise química elementar de AH	34
Tabela 6 Análise química elementar de VC	34
Tabela 7 Análise química elementar de AH de diferentes fontes.....	35
Tabela 8 Razão E_4/E_6 (Absorbância em 465 e 665nm)	37
Tabela 9 Análise térmica de AH e VC (TG e DSC)	42
Tabela 10 Análise dos grupos funcionais ácidos e poder redutor de AH	50
Tabela 11 Análise dos grupos funcionais ácidos e poder redutor de VC	51
Tabela 12 Análise dos grupos funcionais ácidos de diferentes fontes.....	51
Tabela 13 Acidez fenólica, poder redutor e % de O- e P- difenóis de AH	54
Tabela 14 Acidez fenólica, poder redutor e % de O- e P- difenóis de VC	55
Tabela 15 Principais bandas de absorção nos espectros de AH e VC	62
Tabela 16 Parâmetros de ^1H -RMN para AH	65
Tabela 17 Análise de metais de AH e VC	72
Tabela 18 Análise de metais de AHr.....	72
Tabela 19 parâmetros de RPE de AH	75
Tabela 20 Parâmetros de RPE de AHr	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AC = acidez carboxílica

AF = ácido Fúlvico

ϕ - OH = acidez fenólica

AH = ácido húmico

AH = ácido húmico não Ressolubilizado

AHr = ácido húmico Ressolubilizado

AT = acidez total

BO = bovino

Ca(OAC)₂ = acetato de cálcio

CA = caprino

CO = coelho

DSC = Calorimetria de varredura diferencial

HU = Humina

M.O. = matéria orgânica

OV = ovino

PR = poder redutor

SH = substância húmica

TG = Termogravimetria

VC = vermicomposto

RESUMO

Ácidos húmicos (AH) fazem parte da matéria orgânica ambiental e são constituídos por um conjunto macromoléculas similares entre si. Dentre suas importantes funções no ambiente está a de atuarem como ligantes para complexação de íons metálicos micronutrientes de plantas, (MANGRICH, 1988). A produção artificial de substâncias húmicas (SH) por oxidação de carvões (MANGRICH, 1990, 1996) ou por vermicompostagem de restos orgânicos de diversas origens, como lodo de esgoto, resíduos da atividade agrícola, resíduos da indústria de alimentos ou esterco de animais, tem recebido atenção crescente, também como meio de prevenção da poluição ambiental. A vermicompostagem por *Eisenia foetida* foi indicada como uma solução adequada para a biorreciclagem de esterco de animais, (CHAN et al., 1988). Por outro lado, conhecendo-se melhor os constituintes e a estrutura dos produtos da vermicompostagem será possível a utilização mais racional desses materiais orgânicos como recondicionadores das propriedades químicas e físicas de solos degradados por sucessivos cultivos, ou tratamentos inadequados.

Neste trabalho são apresentados os resultados da caracterização por análise química, térmica e espectroscópicas, de AH bem como vermicompostos produzidos com esterco bovino (BO), caprino (CA), de coelhos (CO), e ovinos (OV), de onde foram extraídos os AHs.

O objetivo a longo prazo é propiciar a geração de tecnologia visando diminuir a acumulação de poluentes de esterco e convertê-los em material orgânico útil para a regeneração de solos pobres ou degradados, em razão de sucessivos cultivos e/ou cultivos inadequados.

Os estudos combinados das análises químicas, térmicas, e espectroscópicas da M.O., que constituem os vermicompostos estudados, mostraram um forte caráter aromático com alto grau de substituição, assim como a presença de heterocíclicos nitrogenados aromáticos. Por exemplo, a razão H/C $\sim 1,0$ dos AH suporta este alto teor de estruturas aromáticas. A baixa acidez carboxílica determinada por análise química é confirmada por espectroscopia de infravermelho (IV). A abundante presença de funções amida secundária, fenóis, assim como ésteres em menor proporção, é colocada em evidência por espectroscopia de IV e $^1\text{H-NMR}$. A razão O/C relativamente alta indica material húmico com razoável grau de funções oxigenadas.

Com os dados fornecidos pela espectroscopia de EPR, pode-se concluir que os íons metálicos micronutrientes para as plantas (Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}), estão razoavelmente disponíveis nos AH estudados. Os íons Fe^{3+} formam complexos de spin alto em sítios tetraédricos ou octaédricos com distorção rômica, para os quatro AH estudados e também com simetria axial, provavelmente em estruturas porfirínicas nos AHCA, AHCO. O manganês apresenta-se sob a forma de complexos de esfera externa $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6 - \text{AH}]$, e os íons Cu^{2+} estão em sítios oxigenados, ou também como complexos de Cu^{2+} -porfirina.

ABSTRACT

Humic acids (HA) are part of the environmental organic matter and they are formed by macromolecules similar among them. Among its important functions in the environment, it is the one to act as link for the complexation of micronutrient metallic ions of plants (Mangrich, 1988). The artificial production of humic substances (SH) by coal oxidation (Mangrich, 1990, 1996) or by worm-compost of organic wastes from several origins like drain mud, agricultural residues, feed industry residues or animal manure, has received increasing attention, also as a prevention way of environmental pollution. The worm-composting by *Eisenia foetida* was indicated as adequate solution for the biorecycling. Otherwise, knowing better the constituents and the structure of the worm-composted products, it will be possible the more rational use of these organic matter as regenerator of chemical and physical properties of soils degraded by successive cultivations or inadequate treatments.

The purpose of this study was to present the results of characterization by chemical thermic and spectroscopic analysis of HA as well as worm-compost produced with Cow (CO), goat (GO), rabbit (RA) and sheep (SH) manures, from where it was extracted the humic acid (HA).

The objective in a longer term is to provide the technology generation aiming at decreasing the accumulation of pollutant manures and convert them into useful organic matter for the poor or degraded regeneration or due to successive cultivation and/or inadequate treatments.

The combined studies of the chemical, thermic and spectroscopical analysis of matter organic which constitute the studied worm-composted, showed a strong aromatic character with high degree of substitution, as well as the presence of heterocyclic nitrogenate aromatics. For example, the reason $H/C \sim 1,0$ of HA supports this high content of aromatic structures. The lower carboxylic acidity determined by chemical analysis is confirmed by spectroscopy of Infrared (IR). The abundant presence of secondary amide functions, phenols, as well as esters in smaller proportion, is put in evidence by spectroscopy of IR and 1H -NMR. The ratio O/C relatively high indicates humic matter with reasonable degree of oxygenated functions.

With the data provided by the spectra of EPR, we can conclude that the micronutrient metallic ions for the plants (Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}), are reasonably available in the HA studied. The Fe^{3+} ion form high spin complexes in tetragonal or octahedral sites with rhombic distortion for the four HA studied and also with axial symmetry, probably in porphyrin structures in the HA-GO, HA-RA. The manganese presents itself in the form of external sphere complexes $[Mn(H_2O)_6 - HA]$, and the Cu^{2+} are in the oxygenated sites or also like Cu^{2+} porphyrin complexes.

I - INTRODUÇÃO

A matéria orgânica do solo é importante como depósito de carbono orgânico e tem efeito benéfico na produtividade e fertilidade do solo exercendo influências no crescimento de plantas (DEIANA et al., 1990). É constituída basicamente de compostos resultantes da transformação de resíduos de plantas e animais, (em vários estágios de decomposição) e também de substâncias sintetizadas biologicamente e/ou quimicamente (RASHID, 1985).

Embora a reserva total de carbono em massa no globo terrestre seja de mais que 10^{19} kg, apenas uma pequena fração está ativamente envolvida no fluxo do ciclo de carbono. O reservatório de carbono ativo na terra consiste de carbono em organismos vivos, carbono na atmosfera e carbono na matéria orgânica do solo (MALCOLM et al., 1993).

A matéria orgânica passa por diversas transformações, tornado-se em uma determinada etapa um material amorfo, altamente decomposto, estável, de elevado peso molecular e assumindo aspecto coloidal. A esta matéria orgânica dá-se o nome de substância húmica. As substâncias húmicas são os maiores constituintes orgânicos do solo. São largamente distribuídas sobre a superfície da terra, ocorrendo em quase todos os ambientes terrestres e aquáticos, (RASHID, 1985). Aproximadamente 60 a 70% do total de carbono do solo ocorre na forma de materiais húmicos (GRIFFITH et al., 1975).

Embora constituindo apenas 1 a 10% de carbono orgânico na maioria dos solos agrícolas, as substâncias húmicas são consideradas de importância vital para a fertilidade e a produtividade do solo, por apresentar os elementos encontrados em sua constituição, em uma forma mais solúvel ou disponível para as plantas (KONONOVA, 1966). Estas substâncias servem como fertilizante de liberação lenta, primariamente de nitrogênio, para o crescimento das plantas, bem como para regular a natureza da população microbiana e suas atividades, fornecendo nutrientes orgânicos e inorgânicos essenciais para o crescimento desses microorganismos, fazendo do solo o substrato mais favorável ao seu desenvolvimento (KONONOVA, 1966). A síntese e degradação das substâncias húmicas é um processo dinâmico que atinge o equilíbrio em um determinado ambiente do solo. Esse equilíbrio pode ser perturbado por mudanças ambientais, tais como variações nos teores de ar e água do solo e alterações nas práticas de cultivo (MARTIN et al., 1977). As SH, por serem eficientes complexantes de metais, bons dispersantes, podem agir como agentes oxidantes e redutores tendo inúmeras aplicações (STEVENSON, 1982).

Dentre as propriedades mais importantes que têm sido atribuídas às SH está a formação e manutenção de uma boa estrutura do solo, reduzindo a plasticidade e coesão e aumentando a capacidade de retenção da água. Além disso elevam a capacidade de adsorção de cátions, interagem com óxidos e hidróxidos metálicos e minerais de argila para formar complexos organo-metálicos, são trocadores de íons e depósitos de N, P e S, melhoram a fertilidade pelas modificações nas condições físicas, químicas e biológicas do solo. São também

utilizadas como aditivos para fertilizantes e herbicidas, fornecem carbono como fonte de energia para microorganismos fixadores de nitrogênio, aumentando o crescimento e elevando o rendimento de nutrientes na germinação de sementes e na síntese de clorofila. Na indústria, as SH são usadas como dispersantes, inibidores de corrosão e preservativos para madeira. Na medicina são usadas como agentes anti-microbial, anti-inflamatório, anti-tumoral, como estimulantes para o fígado e para tratamento de queimadura de pele (BRADY, 1983).

A reatividade da matéria orgânica do solo e particularmente das substâncias húmicas é causada largamente pelo seu alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio, tais como: hidroxilas, carboxilas, cetonas, ésteres, etc. Os grupos funcionais predominantes são ácidos carboxílicos e hidroxilas fenólicas (SAAR et al., 1982). Esses grupos são responsáveis pelas reações de quelação dos metais, reações de troca de cátions, formação de sais e formação de complexos com outros constituintes inorgânicos. Os grupos funcionais aumentam em quantidade durante a humificação e diminuem com o peso molecular. São particularmente importantes na formação de complexos organo-metálicos e organo-minerais (RASHID, 1985).

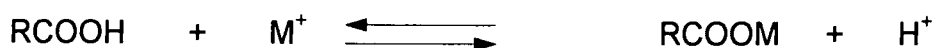
A formação de complexos e a ocorrência de reações de redução leva à mobilização de íons metálicos a partir de compostos pobremente solúveis, (RASHID et al., 1970; RASHID, 1971).

A complexação e redução de micronutrientes por substâncias orgânicas no solo são processos importantes na nutrição mineral de plantas (DEIANA et al., 1989; DEIANA et al., 1991a).

Altas quantidades de SH e outros compostos orgânicos são frequentemente mais encontrados em solos e sedimentos enriquecidos por minerais de argila do que em outros pobres em teores de argila. A adsorção em superfícies de argilas estabiliza os materiais húmicos e protege contra a decomposição química e biológica por longos períodos de tempo. (TIPPING & HURLEY, 1992). Evidências experimentais indicam que minerais de argila exercem um efeito catalítico indireto na decomposição da matéria orgânica e nos processos de humificação. (TIPPING & HURLEY, 1992).

Reações de troca de cátions são um dos muitos tipos comuns de reações entre íons metálicos e compostos húmicos. O H^+ dissociado do grupo funcional é substituído pelo íon metálico.

Essas reações são reversíveis podendo ser representadas pela seguinte equação:



Não foi possível ainda uma análise estrutural completa das SH, devido à complexidade das misturas que as compõem. A dificuldade para classificar substâncias húmicas se deve à sua complexidade, variabilidade, e natureza química incerta. Os esqueletos carbônicos das substâncias húmicas são em grande parte aromáticos. Devido à composição da matéria orgânica original a proporção de estruturas aromáticas é mais alta em SH do solo, carvão, lignitas, e turfas, e baixa em lagos e sedimentos marinhos, onde predominam estruturas alifáticas (RASHID, 1985). Outra evidência recente mostra que estruturas

porfirínicas de SH, que eram ditas serem originárias de clorofila de plantas, são também sintetizadas por actinomicetos nos solos (MANGRICH et al., 1997).

A aromatização das estruturas das SH é consequência também da atividade microbiana, no sentido que, mesmo partindo-se de fontes de carbono não aromáticos, melaninas produzidas por fungos e actinomicetos de solos apresentam razoável grau de aromatização (PAIM et al., 1990, MANGRICH et al., 1997).

A solubilidade em água é considerada como a mais adequada base de separação das SH. Baseado na solubilidade em soluções básicas e soluções ácidas, as SH são convencionalmente divididas em ácido fúlvico (AF), ácido húmico (AH) e humina (HU) (SCHNITZER, 1978).

Ácidos Fúlvicos (AF) são substâncias solúveis em toda faixa de pH. São fracamente aromatizados, pobremente condensadas, e são enriquecidos em grupos funcionais oxigenados, particularmente COOH e OH (SAAR et al., 1982).

Ácidos Húmicos (AH), São solúveis em solução alcalina. são formados por macromoléculas orgânicas que atuam também como ligantes para a complexação de íons metálicos micronutrientes de plantas (MANGRICH et al., 1988). Pertencem à classe dos produtos naturais mais abundantes na biosfera e são os precursores dos combustíveis fósseis. Têm papel importante na agricultura e no ambiente (STEVENSON, 1982). São compostos de alto peso molecular, altamente condensados e polimerizados. As moléculas de ácido húmico podem variar consideravelmente na sua composição, dependendo das unidades disponíveis presentes no ambiente durante sua formação. Entretanto, todas apresentam propriedades semelhantes, as quais estão relacionadas aos seus grupos funcionais,

primariamente grupos COOH e OH fenólicos (SCHNITZER et al., 1972; PAIM et al., 1990; SCHULTEN et al., 1993).

Huminas (HU) são compostos do húmus insolúveis em ácidos e bases fortes, devido às fortes ligações com minerais. Uma vez quebradas, as ligações passam a ser solúveis em meio alcalino. Podem ser também extraídas pela decomposição de material mineral com ácido sulfúrico e fluorídrico (PAIM et al., 1990).

De acordo com dados da literatura (SCHNITZER, 1978), aparentemente as frações de ácido fúlvico e humina seriam estruturalmente semelhantes ao ácido húmico, diferindo apenas na massa molar, teor de grupos funcionais e análise elementar.

Como já foi dito anteriormente, apesar de não caracterizadas totalmente, as SH são misturas de compostos orgânicos contendo vários grupos ligantes do tipo catecolato, salicilato, ftalato e amina, (PERDUE, 1978). Existem na literatura muitas propostas de estruturas para os ácidos húmicos (AH). O modelo abaixo foi proposto por SCHULTEN e SCHNITZER, (1993).

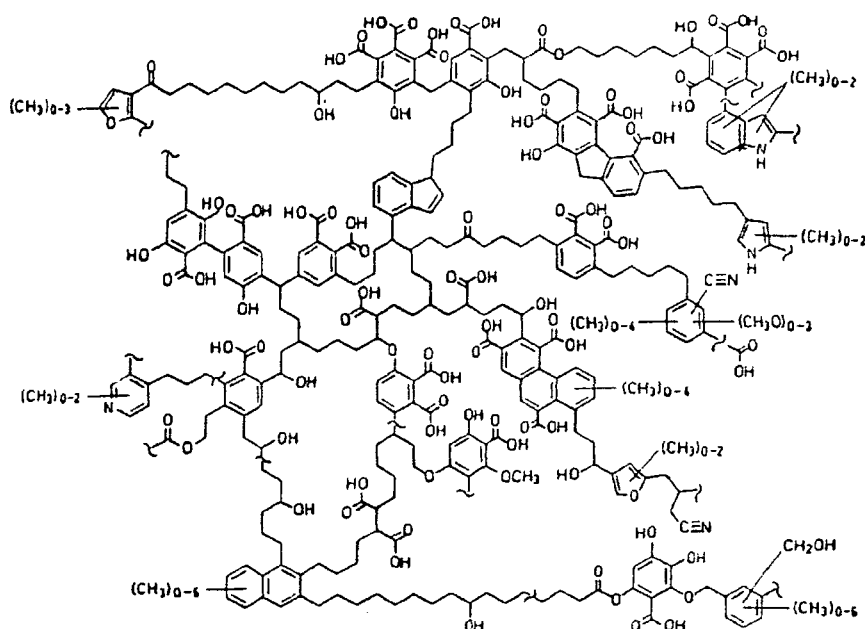


FIGURA - 1: MODELO DE UMA MOLÉCULA DE AH PROPOSTO POR SCHULTEN E SCHNITZER (1993).

O futuro da agricultura, aqui e no resto do mundo, é uma preocupação crescente em consequência do aquecimento global, devido ao excesso de dióxido de carbono na atmosfera e à diminuição do ozônio estratosférico, com possíveis interferências de reações fotoquímicas indesejáveis nos sistemas naturais.

A manutenção da estabilidade estrutural do solo através da adição de M.O. é vital para a sua conservação no futuro, visto que o mesmo é afetado por freqüentes erosões e sucessivos cultivos (MALCOLM et al., 1993).

Os benefícios que a matéria orgânica imprime ao solo, principalmente melhorando a produtividade e a fertilidade, e a influência que as SH exerce sobre ambiente, são bem conhecidos e documentados. Estes efeitos dependem da qualidade e do teor da M.O..

Em anos recentes, a deposição de restos orgânicos de fontes domésticas, industriais e da agricultura tem causado um crescente aumento dos problemas econômicos e ambientais. Muitos desses resíduos contém consideráveis quantidades de contaminantes orgânicos e inorgânicos, tais como: metais pesados, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos e compostos de enxofre bem como detritos patogênicos humanos e de animais. Desde 1978, tem crescido o interesse em um método possível para o processamento, utilizando a minhoca como um agente acelerador da degradação desses detritos (EDWARDS e BOLHEN, 1996). A compostagem é um processo biológico de transformação da matéria orgânica não humificada em SH estabilizadas, com propriedades e características completamente diferentes do material que lhe deu origem. (KIEHL, 1985).

Os esterco de animais vêm sendo empregados como fertilizantes há muito tempo. Os ensinamentos deixados por antigos pesquisadores (DARWIN, 1881), mostram como já, naquela época, se conhecia o valor dos esterco e se sabia como empregá-los. O esterco para se tornar um fertilizante orgânico humificado, com propriedades especiais inexistentes nas dejeções recentes, deve sofrer um processo de fermentação microbiológico, provocando a decomposição e transformação da matéria orgânica, resultando num material humificado estabilizado. Como resultado dessa intensa digestão da M.O. por esses organismos, há liberação de elementos químicos como nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio e magnésio, os quais deixam a forma orgânica, dita imobilizada,

para passarem à forma de nutrientes minerais chamada mineralizada, disponível às plantas (KIEHL, 1985).

A utilização das minhocas para decompor e estabilizar restos orgânicos de várias origens, tais como lodo de esgoto, resíduos de colheitas, rejeitos urbanos (esgoto, lixo), resíduos da indústria alimentícia e esterco de animais, tem recebido grande interesse e popularidade nos últimos anos (ALBANELL et al., 1988.; CHAN et al., 1988; DEIANA et al., 1990; SENESI et al.; 1992).

A produção de húmus por meio de vermicompostagem estabelece custos razoáveis, não introduz componentes tóxicos no sistema a ser utilizado, e não necessita de equipamentos e mão-de-obra grandemente especializadas (SOZZI et al., 1996).

O material húmico de vermicomposto apresenta características semelhantes ao material húmico do solo, com alto grau de conjugação, rico em carbono e razoável teor de nitrogênio (DEIANA et al., 1990; SCHNITZER et al., 1977). (VER)

A prática organizada da vermicompostagem é recente e os estudos têm demonstrado ser uma prática recomendável, tanto para reciclar resíduos orgânicos quanto para fertilizar solos pobres para a agricultura. No Sul do Brasil existem sérios problemas de poluição ambiental por esterco de animais e resíduos da indústria de alimentos, assim como esgotamento de solos agrícolas, por práticas intensivas e às vezes inadequadas, problemas que podem ser atenuados pela introdução da vermicompostagem de forma racional e organizada.

1.1 TRATAMENTO DE DETRITOS ORGÂNICOS-ESTERCOS DE ANIMAIS POR MINHOCAS. (*Eisenia foetida*)

A vermicompostagem é o processo no qual se utilizam as minhocas para digerir a matéria orgânica. Por apresentar uma grande quantidade de microorganismos o esterco é um ótimo meio de cultura (KIEHL, 1985). As minhocas preferem os estercos a outros alimentos, porém, só digerem a M.O., desde que não seja muito ácida e não contenha altos teores de amônia. A composição dos estercos é variável, sendo influenciada por alguns fatores tais como: a espécie animal, a raça, a idade, a alimentação, e as condições do ambiente.

Os organismos fazem parte do solo de maneira indissociável, sendo responsáveis por diversos processos de transformação que ocorrem, principalmente relacionados com a matéria orgânica. A minhoca tem sido considerada um dos animais mais importantes do solo, onde forma extensos canais melhorando a sua estrutura, pelo processamento de materiais que atravessam seu organismo (VAN-RAIJ, 1991). A capacidade da minhoca em promover uma rápida decomposição da matéria orgânica é resultado de ambos: 1º à ação combinada da alimentação das minhocas e 2º da microflora viva no intestino das mesmas, que favorece a colonização microbial. A minhoca induz a uma decomposição parcial, fragmentada do material orgânico, melhorando as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. A minhoca necessita de

matéria orgânica fresca, rica em nitrogênio, como esterco de animais (SENESI et al., 1992; VAN-RAIJ, 1991).

O tempo necessário para que se processe decomposição da matéria orgânica recente em matéria orgânica humificada, e conseqüente mineralização, é grandemente governado pelo teor original de nitrogênio da matéria-prima, o qual determinará a relação carbono/nitrogênio da massa. Os resíduos de animais não são igualmente atacados, nem se decompõem inteiramente de uma só vez; seus vários constituintes são decompostos em diferentes estágios, com diferentes intensidades e por diferentes ações de microorganismos (KIEHL, 1985).

As minhocas são excelentes bioindicadores da saúde relativa dos ecossistemas do solo (EDWARDS et al., 1996).

A maioria dos restos orgânicos podem ser decompostos pelas minhocas, mas alguns necessitam de um pré-tratamento. Nenhuma minhoca sobrevive em restos orgânicos contendo altos níveis de amônia e grandes quantidades de sais inorgânicos. As minhocas são relativamente tolerantes com respeito ao pH, mas preferem matéria orgânica com pH~5,0 (EDWARDS e BOLHEN, 1996).

1.1.2 *Eisenia foetida* (Minhoca Vermelha da califórnia)

A *Eisenia foetida* é a espécie frequentemente mais usada para o manejo de restos orgânicos, porque ela tem uma ampla faixa de tolerância para a temperatura e pode viver em detritos orgânicos com uma boa variação no teor de umidade. Os microorganismos, (bactérias, fungos, protozoários, etc.), constituem um importante componente nutricional para a dieta das minhocas, por conter alto teor de nutrientes.

TABELA - 1: CONDIÇÕES PARA A ATIVIDADE DA *EISENIA FOETIDA* EM RESÍDUOS DE ANIMAIS E VEGETAIS.

CONDIÇÕES	NECESSIDADE
Temperatura	15-20°C (limite 4-30°C)
Teor de umidade	80-90% (limite 60-90%)
Oxigênio exigido	Aeróbio
Teor de amônia nos detritos	menos do que 0,5mg/g
Teor de sais nos detritos	menos do que 0,5%
pH	entre 5 e 9

Fonte: (Edwards e Bohlen, 1996).

1.2 FONTES DE MICRONUTRIENTES

Micronutrientes são os elementos essenciais que as plantas necessitam em pequenas quantidades.

As principais fontes de micronutrientes para as plantas são os minerais e a matéria orgânica. Através de reações de troca ou de mecanismos de complexação, ou de quelação, as substâncias húmicas podem reter em formas disponíveis certos micronutrientes liberados dos minerais ou da matéria orgânica em decomposição (KIEHL, 1985). Através da espectrometria de absorção atômica foi detectada a presença de alguns íons metálicos como :ferro, manganês, cobalto e cobre .

O ferro é o elemento metálico mais comum na crosta terrestre. O comportamento do ferro está intimamente ligado às ciclagens de oxigênio, enxofre e carbono. Em solos, a ocorrência é principalmente na forma de óxidos e hidróxidos. A maioria dos solos tem um conteúdo de ferro suficiente para as necessidades das culturas. A matéria orgânica em solos ácidos aumenta o teor de ferro solúvel, agindo inversamente em solos alcalinos (VAN RAIJ, 1991; KIEHL, 1985).

A deficiência de ferro na planta causa o sintoma conhecido como clorose, que dificulta a penetração do micronutriente nas raízes ou mesmo seu deslocamento na seiva vegetal. Em estudos citados por VAN RAIJ, 1991, foi indicado que solução de ácido húmico rica em ferro adicionada nas soluções nutritivas onde as plantas estão sendo cultivadas, fornece mais ferro e por mais tempo que os sais solúveis de ferro; a explicação está no fato do húmus fornecer

ferro na forma de quelato, que se mantém solúvel no meio de cultura por mais tempo e se desloca na planta mais facilmente (VAN RAIJ, 1993).

O organismo de animais contém cerca de 0,005 a 0,009% de ferro, sob forma complexada, das quais aproximadamente 57% na hemoglobina e 7% na mioglobina. O teor em ferro varia conforme as espécies animais, sendo a quantidade principalmente influenciada pela idade. Certos mamíferos nascem com reserva importante de ferro, como o coelho. Parte do ferro se encontra no organismo complexado ao grupo heme ou cromoprotéico, nos quais está combinado a um grupamento porfirínico ou protoheme (ANDRIGUETTO et al., 1985).

Os teores de manganês, em solos mundiais, variam de 19 a 9000 $\mu\text{g/g}$, com as frequências máximas entre 200 e 800 $\mu\text{g/g}$.

Como acontece com o cobre, o manganês também é adsorvido fortemente pela matéria orgânica, formando complexos insolúveis e estáveis, podendo causar às plantas sintomas de deficiência do micronutriente, principalmente em solos com pH próximo da neutralidade. A forma mais solúvel do manganês existente na solução do solo é íon trocável do Mn^{2+} , o qual é mais facilmente absorvido pelas raízes e as folhas.

O organismo animal contém aproximadamente 0,0005% de manganês que é um constituinte normal dos tecidos animais. O manganês pode estar envolvido no metabolismo dos aminoácidos (ANDRIGUETTO et al., 1985).

A forma iônica mais comum de cobre em solos é Cu^{2+} . O elemento é adsorvido na fração mineral de solos e complexado pela matéria orgânica. Deste

modo é mais difícil ser deslocado por outros íons, ou perdido por lixiviação. Essa forte fixação se deve à formação de complexos e quelatos de cobre com ligno-proteínas, humatos e também pela complexação de cobre com minerais de argila.

O cobre é um constituinte normal e constante do organismo animal e sua concentração varia conforme a espécie e a idade. O cobre transita no organismo animal combinado a algumas proteínas, participando de diversas reações de oxidação no organismo (ANDRIGUETTO et al., 1985).

O cobalto encontra-se mais disponível na forma de cátion, retido por adsorção específica, ou em complexos de matéria orgânica com a fração argila.

O cobalto é essencial para fixação simbiótica de nitrogênio do ar por leguminosas. Além disso, ele é requerido por ruminantes para a síntese da vitamina B₁₂. O cobalto está presente no organismo animal em quantidades traço, provavelmente ligado a proteínas, não se conhecendo ainda a forma destas combinações, salvo no caso da vitamina B₁₂ (cianocobalamina) da qual constitui 4%. Está presente principalmente no fígado, nos rins, no pâncreas e no baço (ANDRIGUETTO, et al., 1985).

1.3 PRINCÍPIOS DA TEORIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) envolve o estudo da interação com a radiação eletromagnética, na região das microondas, de espécies paramagnéticas submetidas a campos magnéticos. Para que num sistema seja observado o fenômeno de ressonância paramagnética eletrônica, é necessário que ele seja composto por átomos que possuam elétrons desemparelhados, ou seja, que tenham momento magnético e momento angular. Dentre os sistemas paramagnéticos destacam-se os íons dos metais de transição e os radicais livres orgânicos.

O valor de g pode ser calculado a partir da posição da linha de ressonância no espectro: $g = h \cdot \nu / \beta_e \cdot H$

Haverá transição entre dois estados de spin quando a frequência (ν) da radiação de microondas satisfaz a equação:

$$\Delta E = h \nu = g \beta_e H_0$$

h = constante de Planck;

β = magneton de Bohr;

H = Campo magnético efetivo;

ν = frequência;

g = Fator de proporcionalidade;

Em compostos contendo átomos leves, como radicais livres orgânicos, o valor de g é próximo ao g do elétron livre ($g_e = 2,0023$), na faixa de 2,0020 a 2,0060. Isto é consequência dos pequenos acoplamentos dos momentos magnéticos do spin com o momento magnético orbital nestes átomos. Em espécies químicas constituídas por átomos paramagnéticos mais pesados, como os dos íons dos metais de transição, esses acoplamentos são maiores e os valores de g sofrem uma variação maior.

Um outro aspecto importante da RPE é que os níveis de energia podem ser subdivididos em consequência da interação do elétron desemparelhado com os dipolos magnéticos dos núcleos vizinhos

Um outro parâmetro do espectro de RPE, a constante de interação Hiperfina (A), é medida em Gauss, como a distância entre as linhas de absorção nas quais se divide a linha única desde que não ocorra interação entre o momento magnético do elétron desemparelhado e o núcleo do átomo. O número de linhas da interação hiperfina é dado pela multiplicidade dos estados de spin nuclear: $(2I + 1)$.

1.3.1 MEDIDAS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica tem sido utilizada no estudo das SH. Além da quantificação e identificação de radical livre, a técnica de RPE pode fornecer outros parâmetros espectroscópicos como o fator g, largura de linha e saturação de potência do sinal do radical livre que podem dar informações detalhadas sobre as SH (MARTIN-NETO et al., 1994 a).

Com a RPE pode-se analisar, não destrutivamente, amostras sólidas, líquidas, gasosas e em solução.

É uma técnica sensível que requer pequenas quantidades da amostra (MANGRICH, 1993). Geralmente 10 mg de amostra pura são suficientes para efetuar o experimento.

2. OBJETIVOS

Foram os seguintes os objetivos deste trabalho:

2.1 - Caracterizar, por análise química, térmica e espectroscópicas, AH bem como vermicompostos produzidos com esterco bovino (BO), caprino (CA), de coelhos (CO), e ovinos (OV), de onde foram extraídos os AHs.

2.2 - Determinar a presença de alguns metais (micronutrientes de plantas) por espectroscopia de absorção atômica. Estudar a interação desses íons metálicos complexados com AH através de espectroscopia de RPE.

2.3 - Fornecer subsídios, para geração de tecnologia visando diminuir a acumulação de poluentes de esterco no ambiente e convertê-los em material orgânico útil para a regeneração de solos pobres ou degradados.

3.2- EXTRAÇÃO DO ÁCIDO HÚMICO POR NaOH e HCl

Os AH foram extraídos de vermicompostos conforme método padrão, (SENESI et al., 1982).

Foram pesados 50g de cada amostra, (preparadas conforme item 3.1) colocadas em frascos de polietileno aos quais foram adicionados 400 mL de solução extratora (NaOH 0,1 mol/L). Passou-se gás nitrogênio pela mistura com agitação durante 10 minutos. Em seguida os frascos foram colocados em agitador mecânico por 24 horas em temperatura ambiente. Após este período, as suspensões foram centrifugadas durante 15 minutos a 3500 rpm. O precipitado (humina, HU) foi separado e seco a temperatura ambiente. Ao sobrenadante alcalino foi adicionado HCl 6 mol/L até pH~2,0. Após 24 horas a suspensão formada foi novamente centrifugada nas mesmas condições anteriores. O produto sólido (AH) foi seco em estufa a 70°C por 24h. O produto seco (AH) e a humina (HU) foram pesados e os teores de AH, AF e a HU foram determinados em relação a massa inicial dos vermicompostos. O teor de AF foi determinado por diferença.

TABELA - 3: RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA M.O.

VC (100g)	AH	AF*	HU
Bovino	3,44%	20,36%	76,20%
Caprino	7,50%	32,66%	59,84%
Coelho	1,76%	26,70%	71,54%
Ovino	4,52%	6,48%	89,00%

*: Calculado por diferença

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- PREPARAÇÃO DOS VERMICOMPOSTOS

Os vermicompostos (húmus de minhoca) foram preparados pelo setor de biologia do centro de pesquisa e processamento de alimentos. CEPPA - FUNPAR/UFPR. Foram preparadas quatro amostras de vermicompostos, procedentes de esterco de bovino, caprino, coelho e ovino. Foi inoculada a minhoca vermelha da califórnia (*Eisenia foetida*) na matéria orgânica fresca (esterco). Utilizou-se 200g de organismo/1000g de esterco. O período de incubação foi de aproximadamente 3 meses. O húmus ficou por 7 dias secando à temperatura ambiente e depois de seco foi moído e peneirado, conservado em recipiente de polietileno até serem efetuadas as análises.

TABELA - 2: CONDIÇÕES DE PREPARAÇÃO DO VERMICOMPOSTO COM *EISENIA FOETIDA*.

CONDIÇÕES	NECESSIDADE
Temperatura	20°C
Teor de umidade	55-75%
Oxigênio	Aeróbio
Teor de amônia nos detritos	menos do que 0,5mg/g
Teor de sais nos detritos	menos do que 0,5%
pH	6

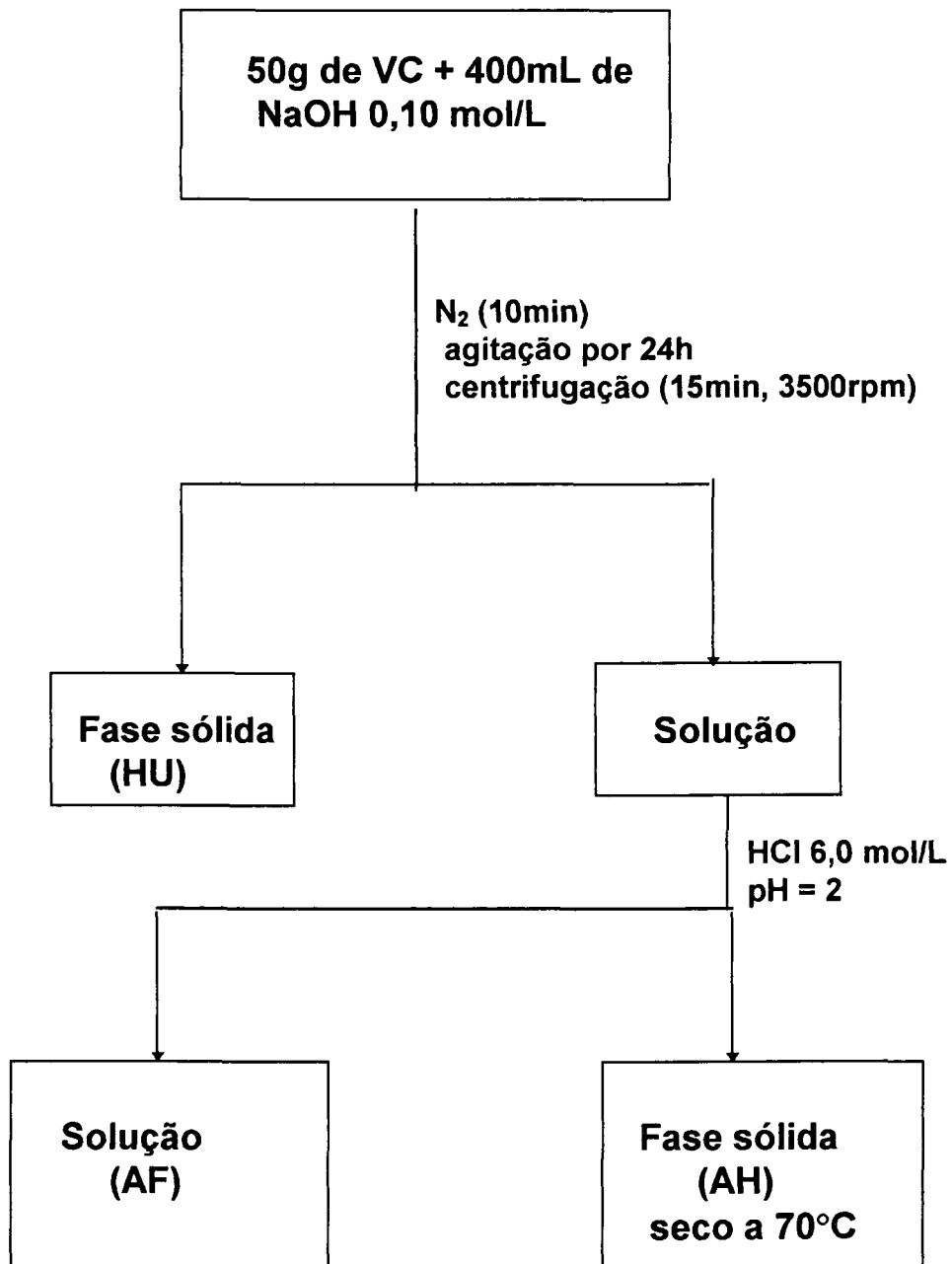
3.2.1-RESSOLUBILIZAÇÃO E REPRECIPITAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁCIDO HÚMICO.

Os procedimentos de extração de AH por NaOH e precipitação por HCl, provavelmente quebram algumas ligações da M.O - metal. Os íons metálicos, embora substituídos, podem recombinar - se diferentemente com a matéria orgânica.

Para evitar a hidrólise da matéria orgânica, a extração de AH por NaOH e a precipitação com HCl foi efetuada apenas uma vez. Apenas para a determinação de metais e para o estudo de RPE, as análises foram feitas com os ácidos húmicos não ressolubilizados (AH), e ácidos húmicos ressolubilizados (AHr).

No estudo de RPE a ressolubilização e reprecipitação tem por finalidade diminuir a linha larga do ferro ($g \sim 2,2$).

O procedimento de extração é o mesmo do item 3.2, apenas foi feita ressolubilização (NaOH 0,10 mol/L) e a reprecipitação (HCl 6,0 mol/L) por mais três vezes.

FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DE AH

3.3- PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

3.3.1- Métodos Químicos

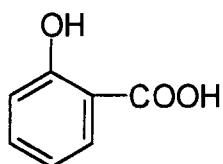
3. 3.1.1- Análise química elementar (C, H, N)

Os resultados analíticos foram computados diretamente em % de peso, e transformados mediante cálculos em % M.O. (descontando a umidade e cinzas). Através da termogravimetria foi possível determinar o teor de umidade e o teor de cinzas das amostras (Tab. 5 e 6; p. 34 e 34). As análises foram feitas em aparelho PERKIN - ELMER modelo 240. As análise de C, H e N foi efetuada pelo LAC (Laboratório Central de Pesquisa e Desenvolvimento, COPEL/UFPR).

3.3.1.2- Determinação de Acidez Total

Foram adicionados a um frasco de polietileno cerca de 50 mg de AH ou VC, juntamente com 20 mL de Ba(OH)_2 0,125 mol/L. Foi preparado simultaneamente um “branco”, constituído somente de solução de Ba(OH)_2 , (20 mL, 0,125 mol/L) e um padrão constituído de ácido salicílico, que é um modelo de grupos carboxílicos e fenólicos para as SH. Agitou-se por 24 horas na temperatura ambiente. A solução foi filtrada e o resíduo lavado com água destilada livre de CO_2 .

O filtrado foi titulado potenciométricamente, sob atmosfera de argônio, para determinar a quantidade de hidróxido de bário em excesso. Para a titulação utilizou-se solução padrão de HCl 0,0494 mol/L até atingir pH 8,4.



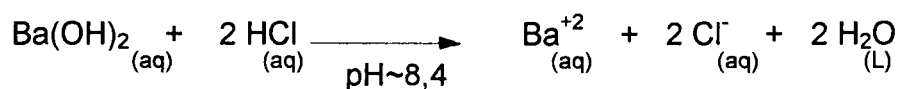
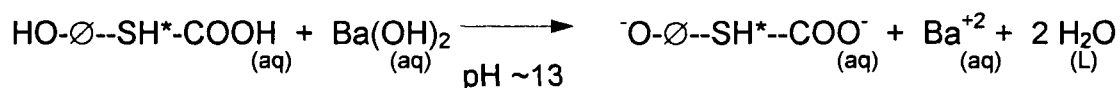
(ácido salicílico utilizado como padrão)

Os cálculos foram efetuados considerando-se a fórmula:

$$\frac{(\text{volume de HCl branco} - \text{volume de HCl amostra}) \times \text{mol/L (ácido)} \times 1000}{\text{peso da amostra (mg)}}$$

(Dados são encontrados nas Tabelas 10 e 11; p. 50 e 51).

Reações para dosagem da acidez total:



[excesso]

* SH = substância húmica

3.3.1.3- Determinação de Acidez Carboxílica

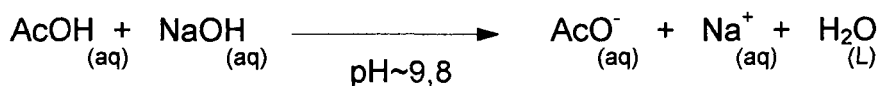
O método utilizado foi o da desprotonação dos grupos carboxílicos com acetato de cálcio. O teor de grupos COOH foi determinado pela titulação do ácido acético produzido na reação com uma base padrão. Foram colocados em frasco de polietileno de 300 mL, aproximadamente 50 mg de amostra de AH ou VC, juntamente com 10 mL de solução 0,5 mol/L de acetato de cálcio ($\text{Ca}(\text{OAC})_2$) e 40 mL de água destilada livre de CO_2 . Paralelamente foi preparado um branco constituído apenas de uma amostra de $\text{Ca}(\text{OAC})_2$ (10 mL, 0,50 mol/l), e um padrão de ácido salicílico. A solução problema foi agitada por 24 horas em temperatura ambiente, foi filtrada e o resíduo lavado com água destilada livre de CO_2 . O filtrado foi titulado potenciométricamente com solução padrão 0,0936 mol/L de NaOH até atingir pH 9,8.

Os cálculos foram efetuados considerando-se a fórmula

$$\frac{(\text{volume de NaOH amostra} - \text{volume de NaOH branco}) \times \text{mol/L (base)} \times 1000}{\text{peso da amostra (mg)}}$$

(Dados na Tabela 10 e 11; p. 50 e 51)

Reações envolvidas na dosagem da acidez carboxílica;



3.3.1.4- Determinação da acidez Fenólica

A quantidade de grupos OH fenólicos foi calculado pela diferença entre a acidez total ($\phi\text{-OH} + \text{COOH}$ em $\text{mmolH}^+/\text{g M.O.}$) e teor de grupos carboxilícos (COOH em $\text{mmolH}^+/\text{g M.O.}$).

$$\phi\text{-OH} = \text{AT} - \text{AC} \text{ (mmolH}^+/\text{g M.O.)}$$

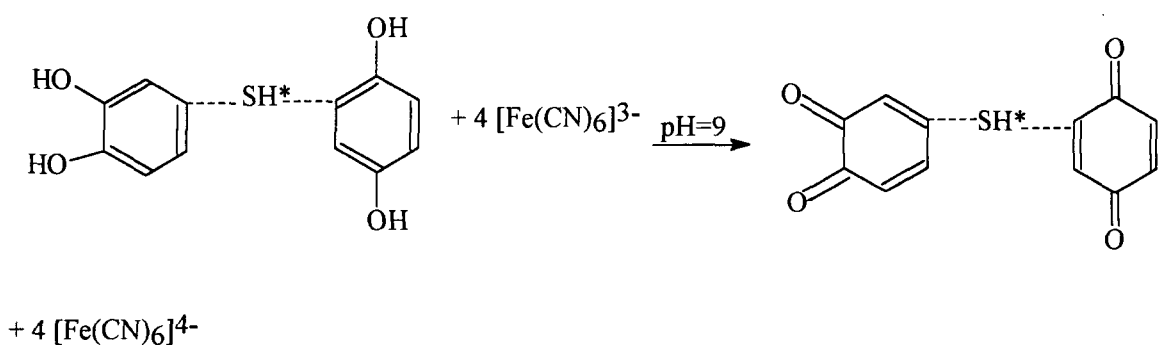
*: SH = Substância húmica
(Dados nas Tabelas 10 e 11; p. 50 e 51)

3.3.1.5- Determinação do Poder Redutor

Foram colocados em uma célula eletroquímica cônica de 50 mL de capacidade, cerca de 2 mg das amostras exatamente pesadas de AH ou VC em 10 mL de solução tampão de borato (pH~9). A solução ficou sob agitação por 1 hora na temperatura ambiente, sob atmosfera de nitrogênio. Para a medida do potencial redutor foram usados eletrodos de epóxi-grafite (trabalho), e o eletrodo de Ag/AgCl.

A mistura de reação foi agitada continuamente durante as sucessivas adições de 1 μ mol de titulante hexacianoferrato III de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) 0,10 mol/L até um total de 10 μ mol. Fez-se a leitura do potencial a cada adição do titulante. A solução foi deixada sob agitação por 12h, após ter sido adicionado todo o titulante. Depois de 12h a leitura do potencial foi feita para se determinar a quantidade de hexacianoferrato que não reagiu. Fez-se um gráfico do potencial (E) versus log n (μ mols de hexacianoferrato (III)). Foi obtida uma reta, na qual determinou-se a quantidade de hexacianoferrato (III) em (μ mol), que não reagiu (Figuras, 18 a 25; p. 55 a 58). A quantidade de hexacianoferrato (III) que reagiu foi determinada por diferença.

EQUAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REAÇÕES DE OXI-REDUÇÃO



SH* = Substância húmica sem o- e p- difenóis e quinonas

SH = Substância húmica

TABELA - 4 DADOS OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO DO PODER REDUTOR.

Amostras	E_i (mV)	E_f (mV)	A(mV)	B(mV)	Log n	n^*
AHBO	-147	-238	-207	-51,7	4,08	5,92
AHCA	-219	-267	-243	-56,2	2,60	7,40
AHCO	-237	-300	-265	-55,5	4,20	5,80
AHOV	-239	-312	-297	-49,7	2,04	7,96
VCBO	-191	-337	-302	-68,5	3,27	6,73
VCCA	-222	-347	-307	-58,0	4,80	5,20
VCCO	-234	-351	-324	-52,9	3,17	6,83
VCOV	-239	-340	-321	-56,0	2,14	7,86

E_i = potencial inicial, (mV) (sem adição de titulante);

E_f = potencial determinado após 12h, (mV);

A = coeficiente linear (intercessão da reta com o eixo - E);

B= coeficiente angular da reta obtida;

Log n = logaritmo do número de μmols de hexacianoferrato III que não reagiu.

n^* = nº de μmols de hexacianoferrato III que reagiu, (calculado por diferença),
 $(10\mu\text{mol} - n)$;

(o nº μmols de ferricianeto que reagiu = o nº μmols de OH de difenóis)

$$E_f = A + B \cdot \log n$$

$$\log n = (E_f - A) / B$$

$$n = 10^{(E_f - A) / B}$$

$$n^* = 10 \mu\text{mol} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} - n$$

3.3.2- Análise Térmica: Calorimetria de varredura diferencial e termogravimetria (DSC e TG)

Os termogramas (Tabela 9; p. 42) e (Figs. 10, 17; p. 46 a 49) foram registrados em aparelho Netzsch, modelo STA série 409 EP. As amostras foram analisadas em atmosfera estática de ar, obtendo-se os termogramas a uma taxa constante de aquecimento de $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, sendo o intervalo de temperatura de 20°C a 950°C . As amostras foram colocadas em cadinhos de alumina (Al_2O_3). Para a curva de calibração foi feita a medida com dois cadinhos vazios. Para determinação dos valores de variação de entalpia foram integradas as curvas de DSC, usando o índio como material de referência. ($\Delta H_{\text{fusão}} = 28,5 \text{ J/g}$ e $T_{\text{fusão}} = 429,76 \text{ K}$).

3.3.3- Métodos Espectroscópicos

3.3.3.1- Espectroscopia Eletrônica (UV - Vis)

Para as análises de UV-Vis foram preparadas soluções contendo 2 mg de amostras dissolvidos em 10 mL de NaHCO_3 0,50 mol/L. Os espectros de UV - Vis foram registrados em temperatura ambiente, em espectrofotômetro HP 8452 A (Figs. 2 a 9; p. 38 a 41) e os valores razão E_4/E_6 (absorção em 465 e 665 nm) na Tabela. 8 (p. 37).

3.3.3.2- Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram registrados em espectrofotômetro BOMEN FTIR, série MB, utilizando-se amostras preparadas em pastilhas de KBr. Estas foram obtidas por prensagem de mistura preparada com 1mg de amostra e 99mg de KBr de grau espectroscópico. Os espectros encontram-se nas Figuras, 26 e 27 (p. 63) as atribuições das bandas mais características encontram-se na Tabela 15 (p. 62).

3.3.3.3- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN).

Os espectros de ^1H RMN foram registrados na temperatura ambiente em espectrofotômetro Bruker AC-400, usando-se solução preparada com 50 mg de amostra em 1mL de solução 0,3 mol/L de NaOD/D₂O. Os espectros foram efetuados no Departamento de Bioquímica da UFPR, e encontram-se nas Figuras 28 a 31 (p. 68 a 71.). A Tabela 16 (p. 65) mostra a atribuição dos picos mais característicos.

3.3.3.4-Espectrometria de Absorção Atômica (Análise de Metais)

Por espectrometria de absorção atômica foi efetuada a dosagem de metais (Mn, Fe, Co e Cu). As análises foram registradas em espectrofotômetro Varian modelo 250 Plus com corretor de Deutério.

As análises foram efetuadas pelo Laboratório de Análises Ambientais do ISAM/ PUC-PR. (Dados nas Tabelas, 17 e 18; p. 72)

3.3.3.5- Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Cerca de 50 mg de cada amostra de AH ou VC reduzida a pó foram colocados em tubos de quartzo para efetuar as análises.

Os espectros de RPE foram registrados na temperatura ambiente, em faixa de modulação e frequência de aproximadamente 9,5 GHz. Os valores dos parâmetros de RPE (g e A) foram obtidos por tratamento e simulação dos espectros com os programas de computador Win-EPR^R e SimFonia^R.

Os espectros de RPE das amostras estão nas Figuras 32 a 58 (p. 80 a 93) e os parâmetros de RPE (valores de A e g) nas Tabelas 19 e 20 (p. 75).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Análise elementar

Segundo RASHID et al. (1971) dependendo da fonte da M.O., o grau de humificação, a massa molar e as condições ambientais, a composição elementar das SH pode diferir significativamente. O aumento da massa molar das SH eleva o teor de carbono e diminui o teor de oxigênio. A razão N/C têm sido usada para identificar a fonte da matéria orgânica. Razões N/C mais elevadas apontam para M.O. original mais alifática e proteinácea. Baixa razão N/C sugere M.O. original oriunda de vegetais superiores (material com maiores teores de lignina) (DEIANA et al. 1990).

TABELA - 5: ANÁLISE ELEMENTAR DOS AH* (C, H, N)

Amostra	%C	%H	%N	%O+S	H/C	N/C	O/C
AHBO	53,81	4,10	5,20	36,89	0,92	0,08	0,51
AHCA	48,14	4,45	5,84	41,57	1,11	0,10	0,58
AHCO	48,35	3,30	7,80	40,55	0,82	0,14	0,56
AHOV	60,22	4,77	4,44	30,57	0,95	0,06	0,43

* (Os teores de C, H e N, em % de M.O.).

*(valores de H/C, N/C e O/C em razão atômica).

TABELA - 6: ANÁLISE ELEMENTAR DOS VERMICOMPOSTOS* (C, H, N)

Amostra	%C	%H	%N	%O+S	H/C	N/C	O/C
VCBO	72,38	6,20	4,28	17,14	1,03	0,05	0,18
VCCA	53,37	4,46	3,86	38,31	1,00	0,06	0,54
VCCO	51,41	4,21	5,02	39,36	0,98	0,08	0,57
VCOV	54,92	4,97	4,91	35,20	1,08	0,07	0,48

*(Os teores de C, H e N, em % de M.O.).

*(Valores de H/C, N/C e O/C em razão atômica).

TABELA - 7: ANÁLISE ELEMENTAR DE AH EXTRAÍDOS DE DIFERENTES FONTES.
(AH extraídos de Lodo de esgoto, esterco, vermicompostos, solo e de melaninas de fungos).

Amostra	%C	%H	%N	%O+S	H/C	N/C	O/C
AH lodo	51,70	6,40	7,90	34,00	1,48	0,13	0,49
AH esterco	55,30	5,00	5,10	34,60	1,08	0,07	0,46
AHVC	54,70	4,30	4,50	36,40	0,94	0,07	0,48
AH solo	54,40	4,90	4,10	34,70	1,08	0,06	0,47
AH melanina	53,00	n.d	6,00	n.d	n.d	0,09	n.d

Fonte: Schnitzer et al., 1977; Deiana et al., 1990; Paim et al., 1990.

*(Os teores de C, H e N, em % de M.O.).

*(Valores de H/C, N/C e O/C em razão atômica).

Os dados analíticos dos AH mostrados na Tabela 5, nos permitem as seguintes observações:

Os percentuais de carbono das amostras de AHBO e AHOV são próximos aos valores encontrados para AH extraídos do solo (Tab.7) (SCHNITZER, 1977).

O teor de nitrogênio encontrado para todas as amostras de AH são mais elevados quando comparados com os AH do solo e são análogos aos valores encontrados para melaninas de fungos e actinomicetos (Tab. 7) (PAIM et al., 1990; GOMES et al., 1996).

A razão atômica H/C, em todas as amostras, próxima a 1, indica forte caráter aromático desses AH (NASCIMENTO, 1990). O baixo valor de H/C para as amostras de AH de coelho pode ser indicativo de estruturas aromáticas com alto grau de condensação, ao contrário do AHCA que apresentaria os grupos aromáticos menos condensados e menos substituídos (DEIANA et al. 1990).

Em geral se observa um maior teor de nitrogênio e menor razão H/C nas amostras de AH (Tab. 5) em relação ao correspondente VC (Tab. 6). Este fato pode ser indicativo de uma perda, durante o processo de extração dos AH, de compostos não aromáticos carentes de nitrogênio, como por exemplo carboidratos, como poderá ser confirmado também por análises térmicas (item 4.3)

Devido ao alto teor de cinzas para VCBO (Tab. 9; p. 42), os dados analíticos dessa amostra podem ser errôneos, por causa da possível presença de C, H e N inorgânicos.

A relação N/C é mais alta para AH extraídos de VC do que para AH do solo (AH solo a razão $N/C \leq 0,06$). Para os AHCA e AHCO os valores estão próximos daqueles encontrados para AH extraídos de lodo de esgoto (DEIANA et al., 1990). A baixa razão O/C indica escassa quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio.

4.2- Espectroscopia Eletrônica (UV-Vis)

A técnica de UV - Vis é utilizada para medidas da chamada razão E_4 / E_6 das SH (CHEN et al., 1977), ou seja, a razão das absorbâncias entre 465 nm (E_4) e 665nm (E_6). Este parâmetro tem sido utilizado para a medida do grau de humificação (SCHNITZER et al., 1978.; BRAVARD et al., 1991).

TABELA - 8 RAZÃO E_4 / E_6 (ABSORBÂNCIA ENTRE 465 E 665 nm) DE AH E VC.

	E_4 / E_6	
	AH	VC
BOVINO	2,44	1,20
CAPRINO	1,61	1,19
COELHO	1,60	1,24
OVINO	1,56	1,20

Os valores da razão E_4/E_6 obtidos a partir dos espectros de UV - Vis para as amostras de AH e VC (Tab. 8 e Figs. 2 a 9; p. 38 a 41) apresentam-se muito baixos em comparação com os de AH do solo ($E_4 / E_6 = 4,5 - 6,0$; CHEN et al., 1977). Isto indicaria alto grau de conjugação ou condensação de constituintes aromáticos (KONONOVA, 1966), e/ou elevada massa molar, assim como um baixo teor de funcionalidades carboxílicas (CHEN et al., 1977). Estes baixos valores da razão E_4 / E_6 concordam com os dados da razão H/C conforme visto no item anterior.

Há que se fazer ressalvas na interpretação das razões E_4 / E_6 dos VC tendo em vista os teores de cinzas dessas amostras. Não obstante, no caso do AH e VC de bovino, onde houve a maior queda do valor da razão E_4 / E_6 (E_4 / E_6 AHBO= 2,44; E_4 / E_6 VCBO= 1,20, isto foi concordante com a queda correspondente da razão O/C (O/C AHBO= 0,51: O/C VCBO= 0,18), o que sugere menor teor de grupos funcionais oxigenados e consequentemente maior grau de condensação aromática (DEIANA, et al., 1990).

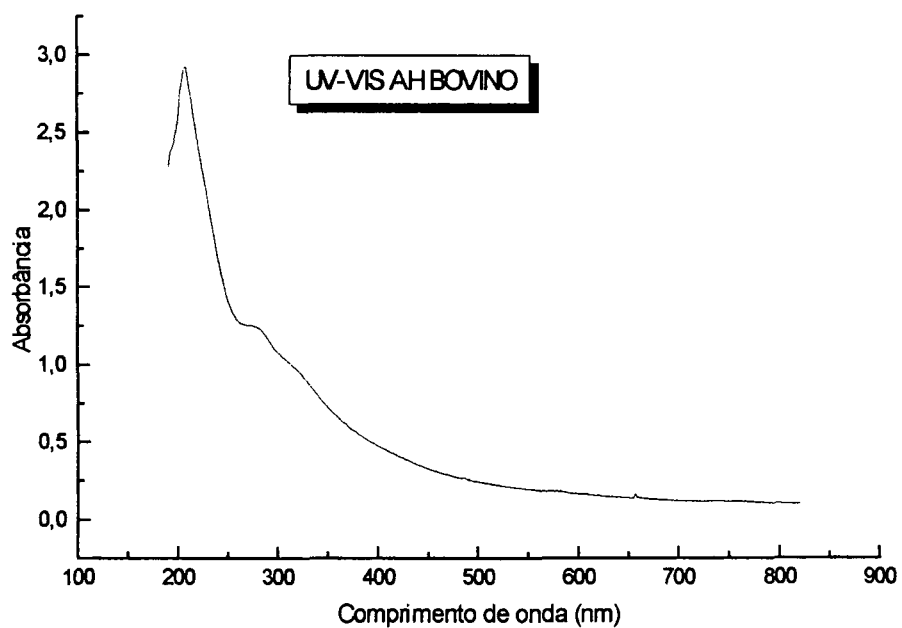


FIGURA 2: ESPECTRO DE UV-VIS DE AH BOVINO (solução 0,5 mol/L de Na_2CO_3)

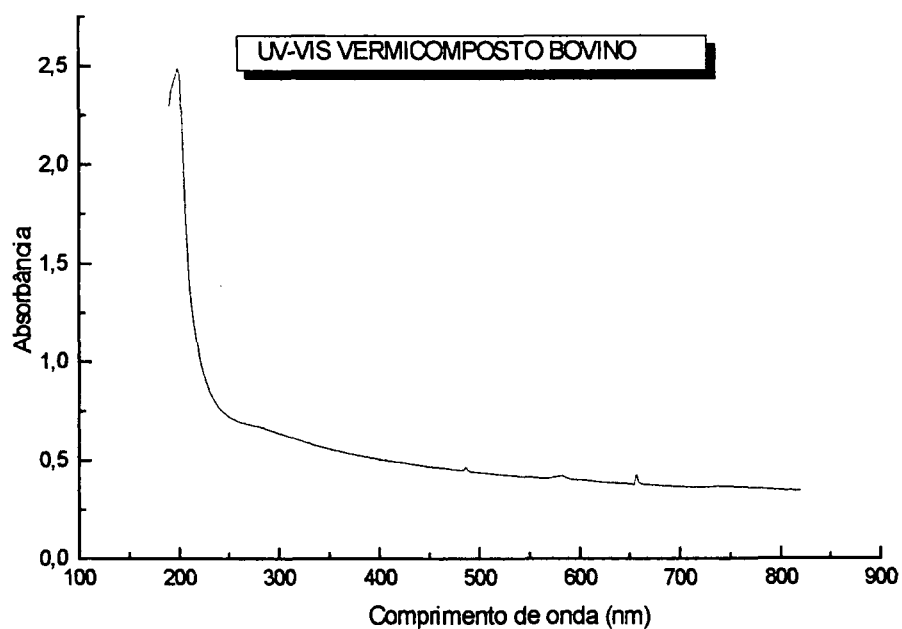


FIGURA 3: ESPECTRO DE UV-VIS VC BOVINO (solução 0,5 mol/L de Na_2CO_3)

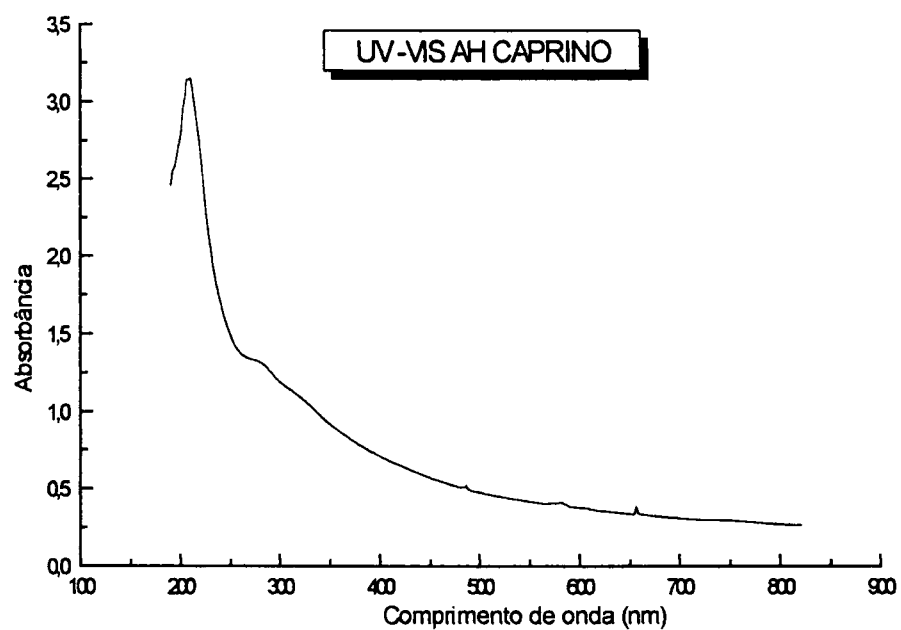


FIGURA 4: ESPECTRO DE UV-VIS AH CAPRINO (solução 0,5 mol/L de Na_2CO_3).

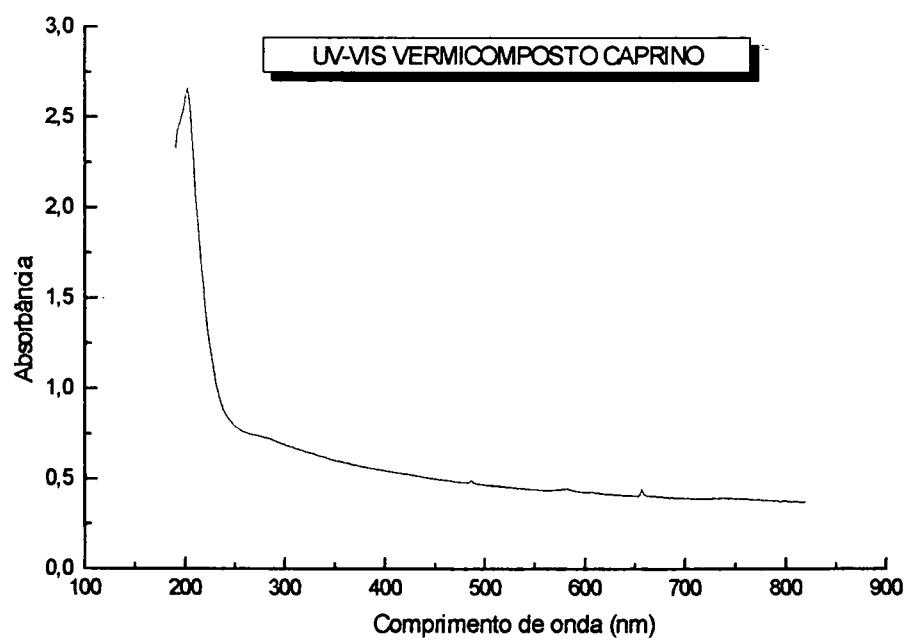
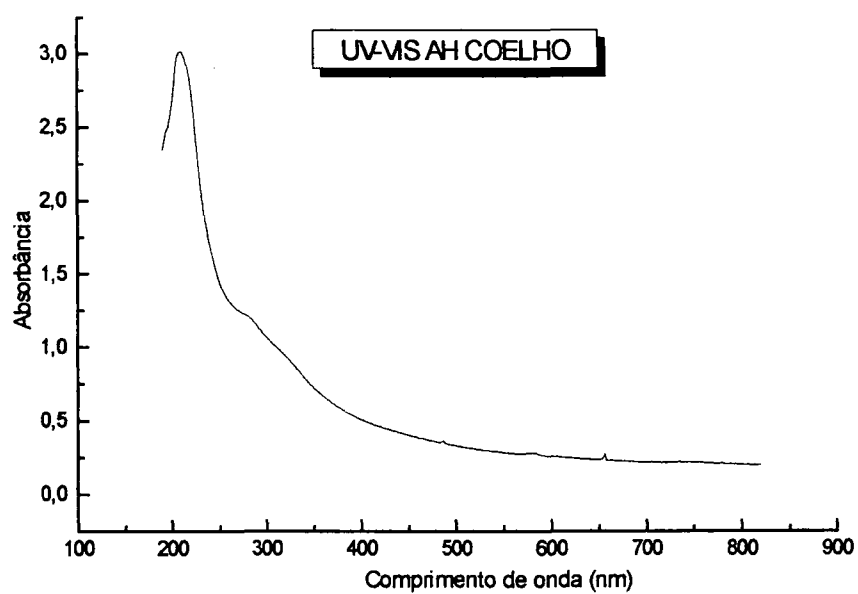
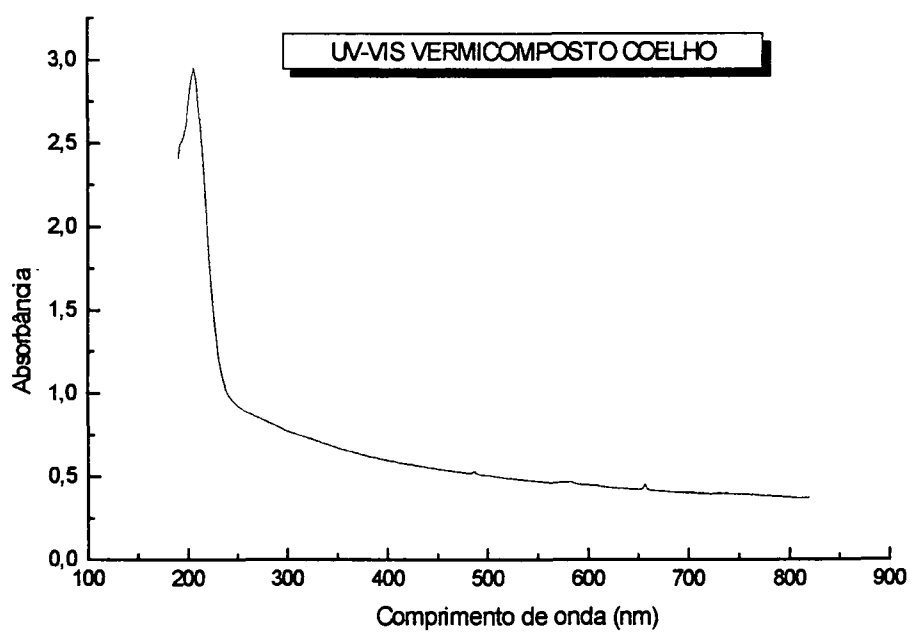


FIGURA 5: ESPECTRO DE UV-VIS DE VC CAPRINO (solução 0,5 mol/L de Na_2CO_3)

FIGURA 6: ESPECTRO DE UV-VIS DE AH COELHO (solução 0,5 mol/L de Na_2CO_3)FIGURA 7: ESPECTRO DE UV-VIS DE VC COELHO (solução 0,5 mol/L de Na_2CO_3)

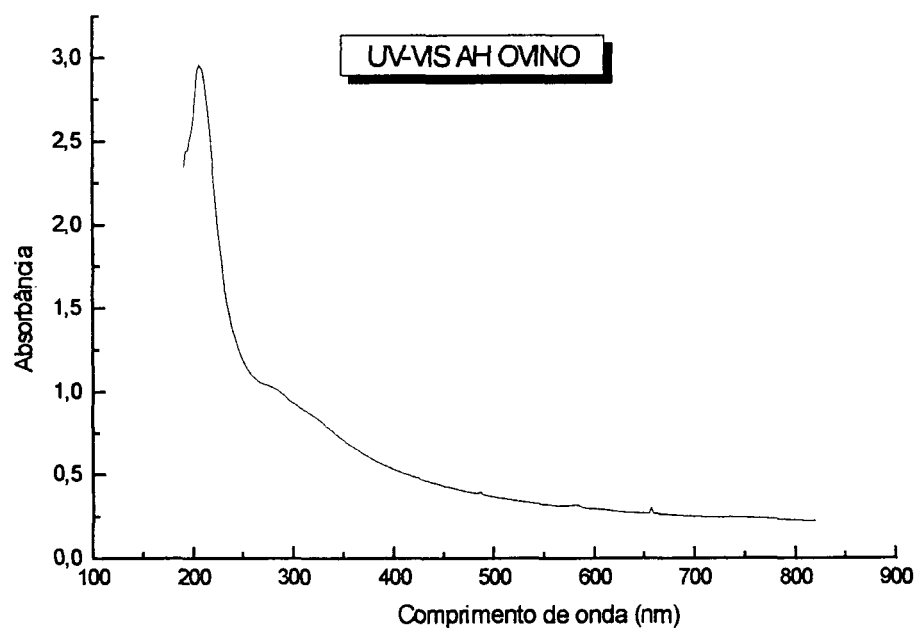


FIGURA 8: ESPECTRO DE UV-VIS DE AH OVINO (solução 0,5 mol/L de Na_2CO_3)

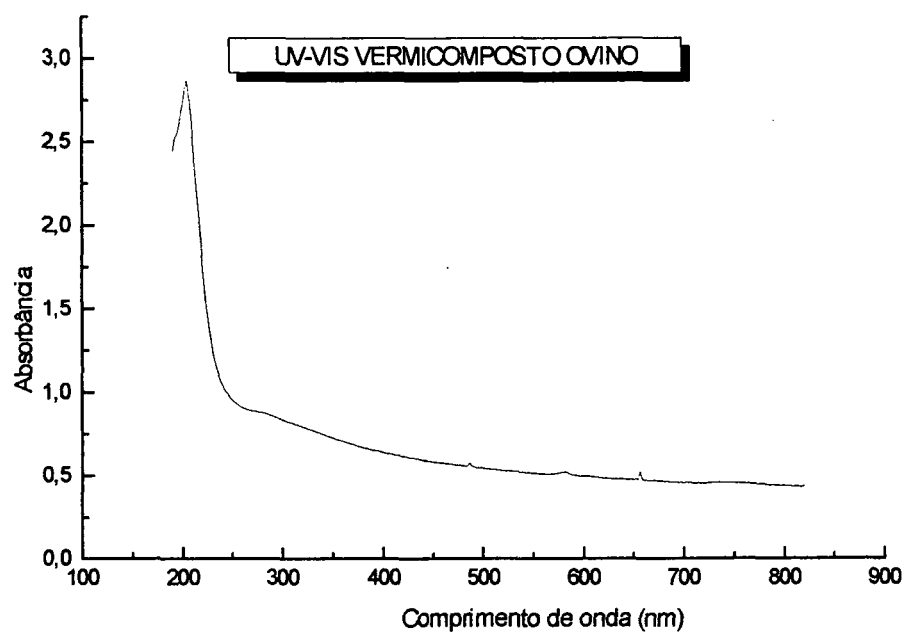


FIGURA 9: ESPECTRO DE UV-VIS DE VC OVINO (solução 0,5 mol/L de Na_2CO_3)

4.3 - Análise Térmica (DSC e TG)

Existem poucos dados termoanalíticos sobre VC e AH deles derivados (LAMIN, 1996), devido provavelmente a baixa resolução das curvas. Encontram-se na literatura no entanto muitos estudos sobre análise térmica de frações de AH do solo (SCHULTEN et al., 1993a; SORGE et al., 1994; SCHULTEN et al., 1995 a; WILCKEN et al., 1997).

Nos termogramas de VC e AH deste trabalho as curvas mostram picos típicos de AH bem definidos (Figs. 10 a 17; p. 46 a 49; Tab. 9; p.42)

TABELA -9: DADOS OBTIDOS NA ANÁLISE TÉRMICA DOS AH E VC (TG E DSC).

		AH		VC	
	Temperatura °C	~300°C	~500°C	~300°C	~500°C
BO	ΔH (J/g)	-1399	-3526	-2118	
	perda de massa %	32,00 ^a	33,00 ^a	20,50 ^a	6,90 ^a
	teor de cinzas %	49,20 ^b	50,80 ^b	74,70 ^b	25,30 ^b
CA	ΔH (J/g)	-1209	-3270	-3294	-717
	perda de massa %	33,50 ^a	31,50 ^a	57,50 ^a	12,50 ^a
	teor de cinzas %	51,50 ^b	48,50 ^b	82,10 ^b	17,90 ^b
CO	ΔH (J/g)	-892	-2516	-1633	-553
	perda de massa %	27,30 ^a	27,90 ^a	38,60 ^a	12,70 ^a
	teor de cinzas %	49,50 ^b	50,50 ^b	75,20 ^b	24,80 ^b
OV	ΔH (J/g)	-1574	-3934	-3168	-1585
	perda de massa %	36,30 ^a	29,70 ^a	52,20 ^a	16,30 ^a
	teor de cinzas %	55,00 ^b	45,00 ^b	76,20 ^b	23,30 ^b

a: em % da amostra total

b: dados em % de M.O. (descontado a umidade e % de cinzas).

c: dados em matéria seca

O estudo dos VC e seus AH por análise térmica (DSC e TG) resultou em informações importantes para se conhecer mais sobre AH extraídos de VC de origem animal. Os teores de cinzas, por exemplo, quando determinados por análise térmica, podem vir acompanhados de algumas informações qualitativas como perda de água, descarbonatação, e outras, impossíveis de serem obtidas no processo tradicional da simples combustão.

O elevado teor de cinzas encontrado no VCBO (70,21%) (Tab.9, p.43) deve estar associado com a absorção de silício e argilas do solo durante o processo de alimentação do animal (VAN-RAIJ, 1991). Observa-se, no entanto, um pico endotérmico no termograma do AHBO, entre 300 e 400 °C típico de desidroxilação da goetita (FeOOH) (TAN, 1993). Para evitar a hidrólise da M.O., que poderia formar produtos diferentes daqueles presentes inicialmente nas amostras, a extração por NaOH (0,1 mol/L) e a precipitação com HCl (6,0 mol/L) dos AH foi efetuada apenas uma vez. Esta pode ser a razão dos teores de cinzas relativamente altos encontrados também nos AH. Para a análise por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (item 4.9; p. 75) tentou-se baixar os teores de cinzas repetindo-se por mais duas vezes o processo de extração dos AH.

As curvas das análises térmicas (TG) indicam uma contínua perda de massa que impede um estudo rigoroso quantitativo. Entretanto observa-se uma tendência diferente nos VC em relação aos respectivos AH. As curvas de TG de AH mostram aproximadamente a mesma perda de massa em ambos os processos de degradação, enquanto que as curvas dos VC apresentaram uma perda de massa maior a ~300°C do que a ~500°C.

Por outro lado as curvas de DSC mostram um pequeno pico endotérmico atribuído à perda de umidade ($t < 125^{\circ}\text{C}$), e dois picos exotérmicos maiores a $\sim 300^{\circ}\text{C}$ e 500°C . As curvas de DSC mostram que a emissão de energia do processo a $\sim 500^{\circ}\text{C}$ é maior que a $\sim 300^{\circ}\text{C}$ nos AH (Tab.9; Figs. 10, 12, 14 e 16, p. 46, 47, 48 e 49) enquanto que um comportamento oposto é observado para os VC (Tab. 9; Figs. 11, 13, 15 e 17, p. 46, 47, 48 e 49). Como para os AH a perda de massa é aproximadamente a mesma nos dois processos, uma emissão de energia mais alta por unidade de matéria nos processos a $\sim 500^{\circ}\text{C}$ pode ser deduzida, indicando um mais alto nível de ligações fortes em AH do que em VC.

As SH parecem ser constituídas por núcleos alquil-aromáticos que podem estar ligando carboidratos, proteínas, lipídios e matéria inorgânica (SCHULTEN et al., 1993 b; SCHULTEN et al., 1995 b). Estes autores sugeriram que o perfil térmico bimodal das curvas é indicativo de dois tipos de ligações para estabilização da M.O. em substâncias húmicas: ligações intramoleculares entre os componentes da M.O. (pico $\sim 300^{\circ}\text{C}$) e ligações intermoleculares de organo-minerais ($\sim 500^{\circ}\text{C}$), sendo que o último renderia mais materiais termo-estáveis do que a anterior (SCHULTEN et al., 1993 a; SORGE et al., 1994).

Com base nestes estudos e nos resultados obtidos neste trabalho, é possível sugerir que a matéria inorgânica livre, (não ligada a M.O.) e os constituintes orgânicos periféricos fracamente ligados, foram parcialmente perdidos durante o processo de extração dos AH a partir dos VC. Este fato é particularmente evidente para as amostras de bovino (Fig.10 e 11; p. 46). A perda de massa de carboidratos, lipídios, proteínas etc. poderia ser coerente com o alto teor de M.O. aromática nos AH,

anteriormente deduzido pela sua baixa razão atômica H/C (Tab. 5 e 6; p. 34) e os baixos valores de E_4/E_6 (Tab.8; p. 37). Contudo a perda de proteínas contrasta com os altos teores de nitrogênio destes AH. Este fato pode ser explicado admitindo-se que uma grande parte do nitrogênio pode estar constituindo estruturas heterocíclicas dos núcleos dos AH (SCHULTEN et al., 1993; SCHULTEN et al., 1992). A presença de heterocíclicos nitrogenados nos AH será evidenciada mais adiante por espectroscopia de ^1H -RMN e RPE

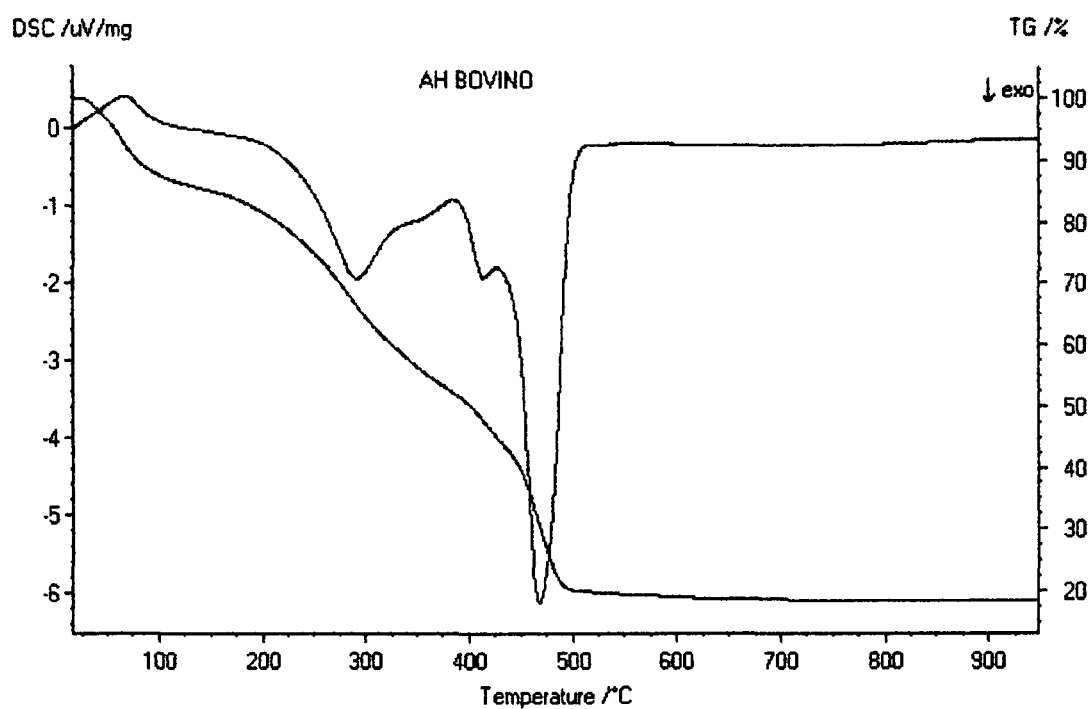


FIGURA 10: TERMOGRAMA DE AH BOVINO

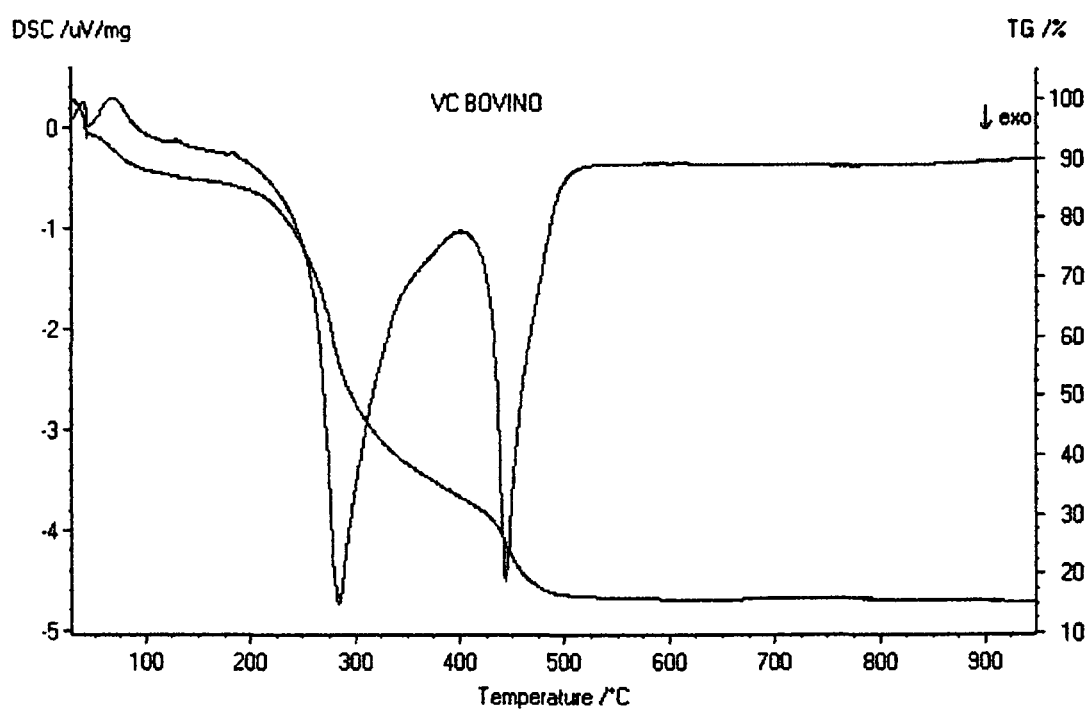


FIGURA 11: TERMOGRAMA DE VC BOVINO

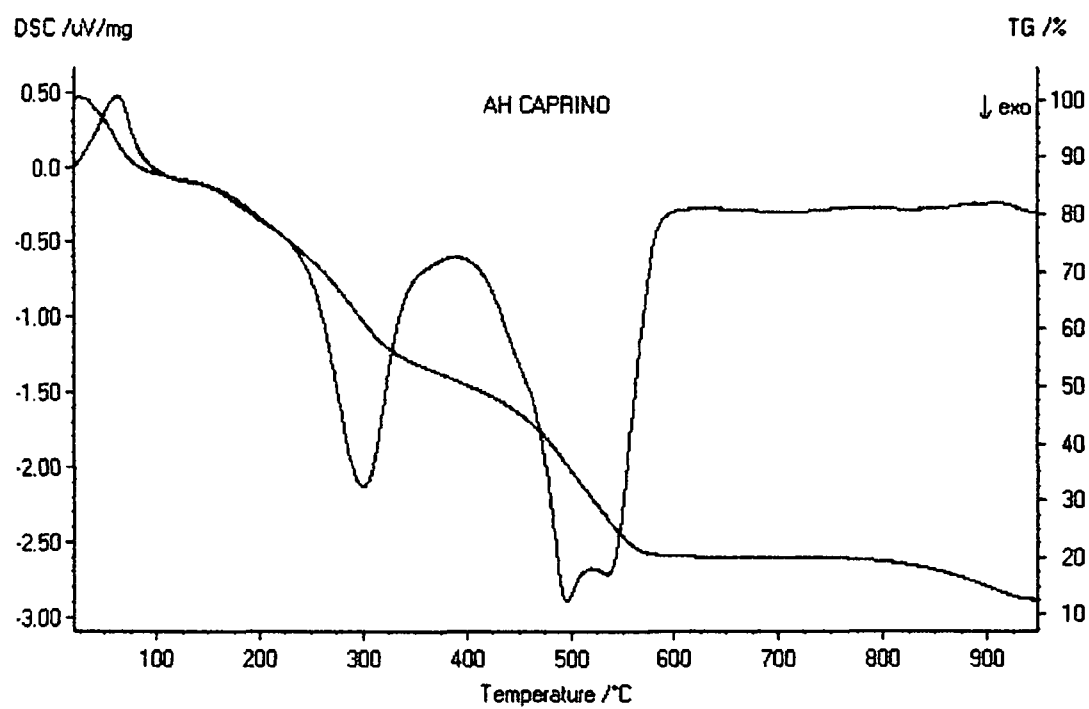


FIGURA 12: TERMOGRAMA DE AH DE CAPRINO

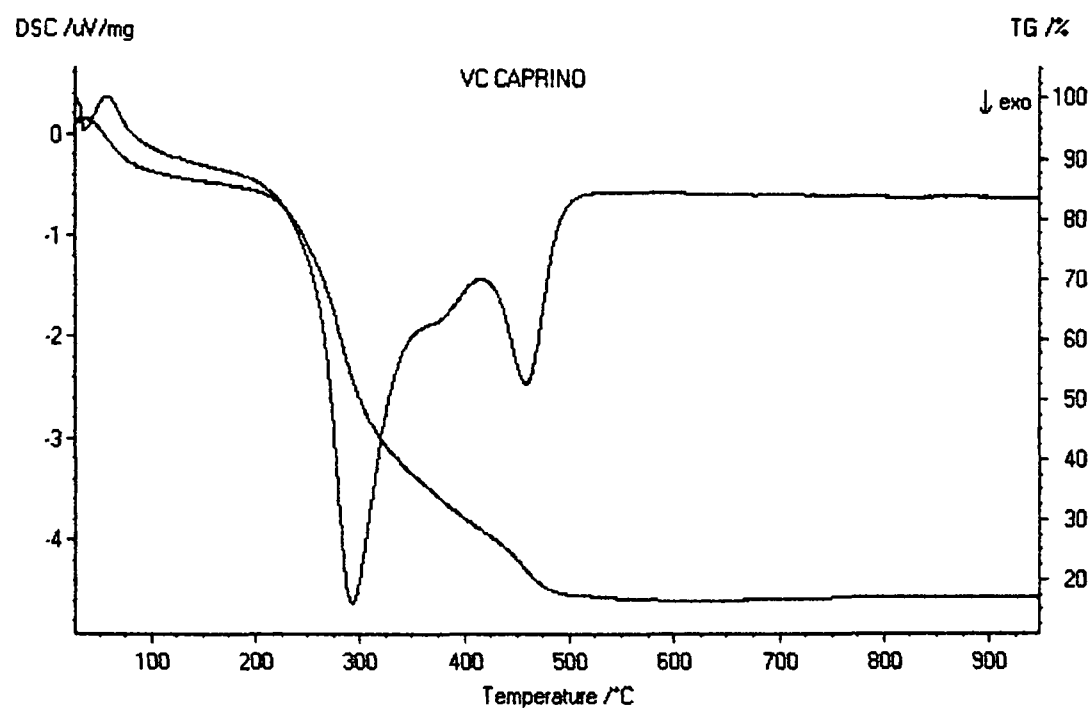


FIGURA 13: TERMOGRAMA DE VC DE CAPRINO

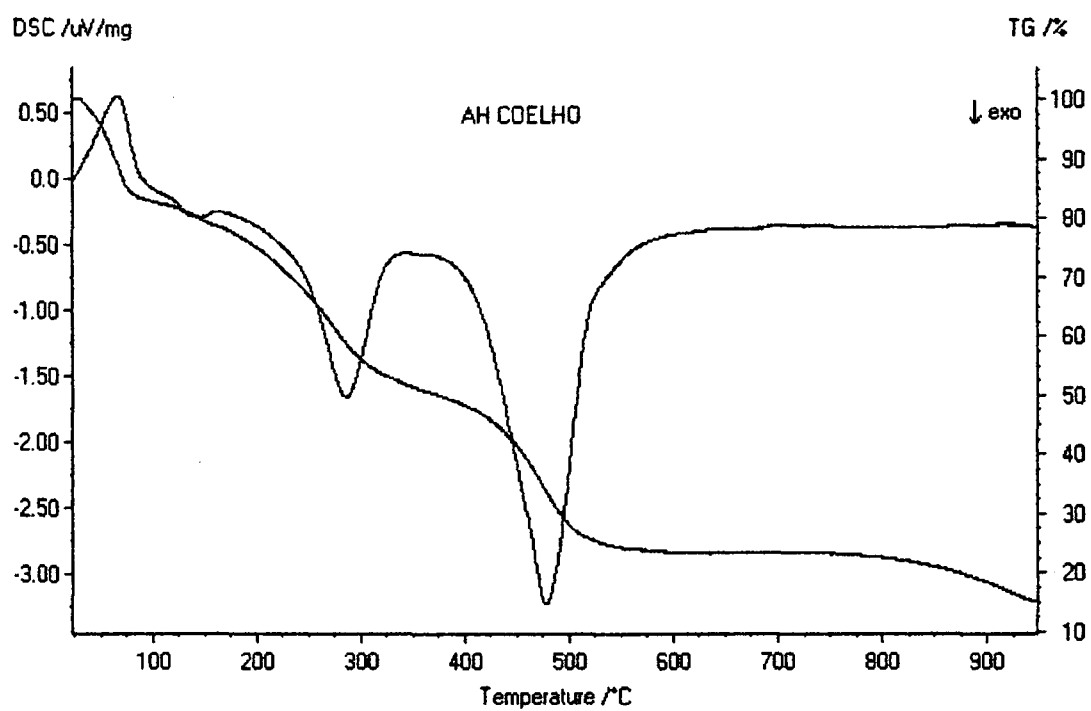


FIGURA 14: TERMOGRAMA DE AH DE COELHO

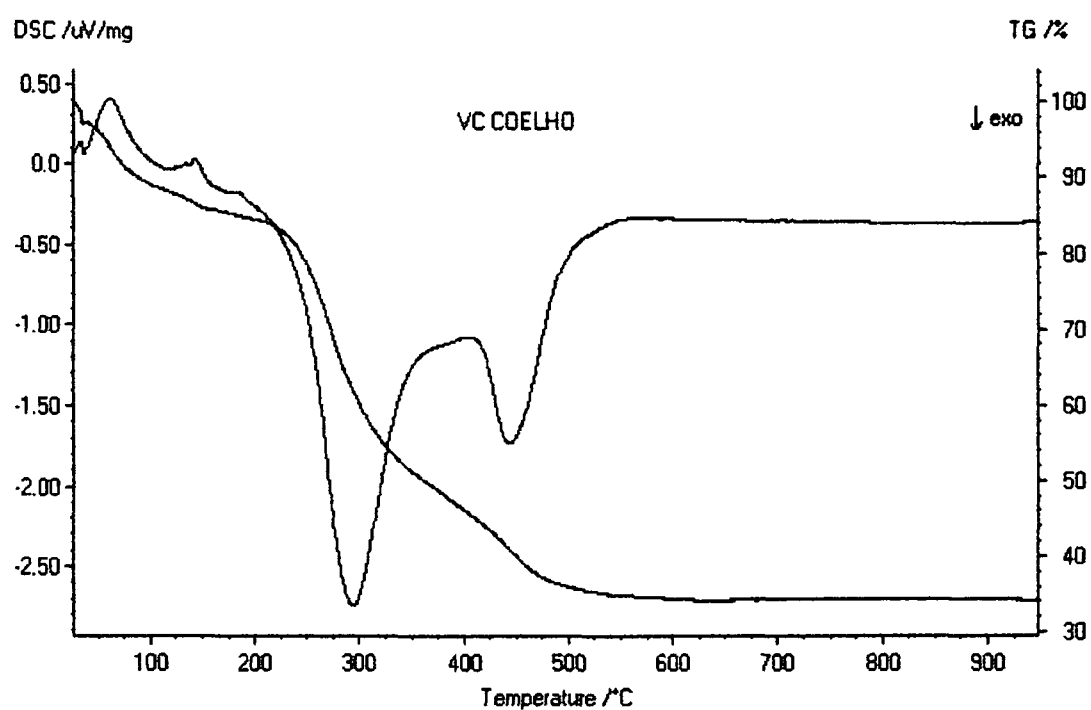


FIGURA 15: TERMOGRAMA DE VC DE COELHO

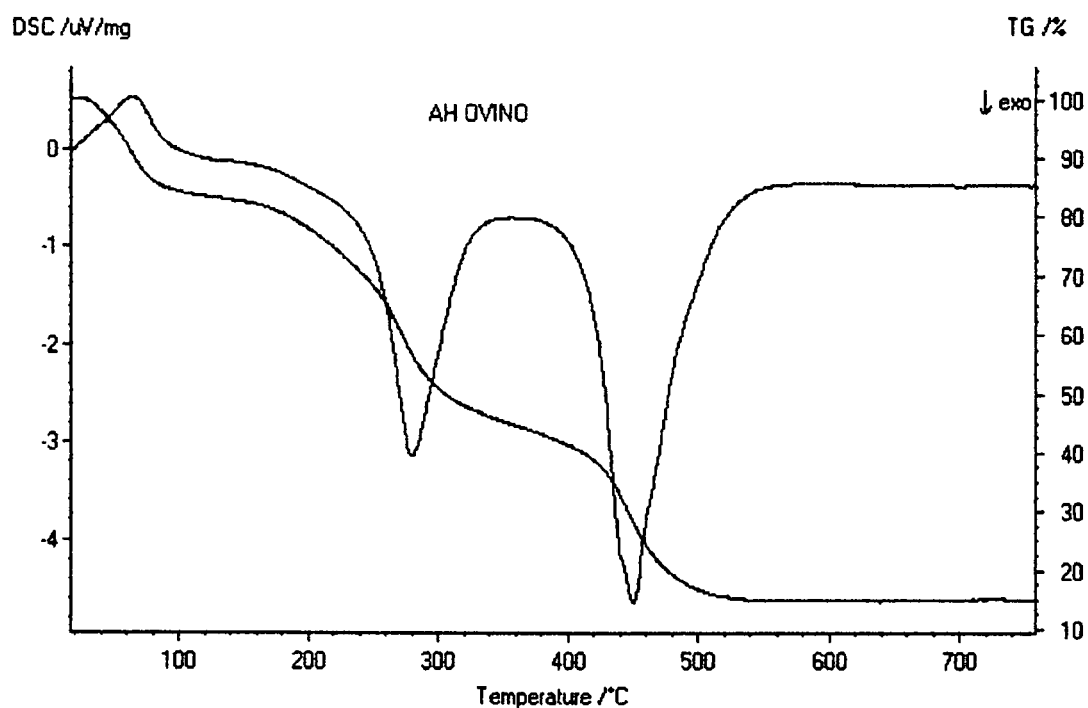


FIGURA 16: TERMOGRAMA DE AH DE OVINO

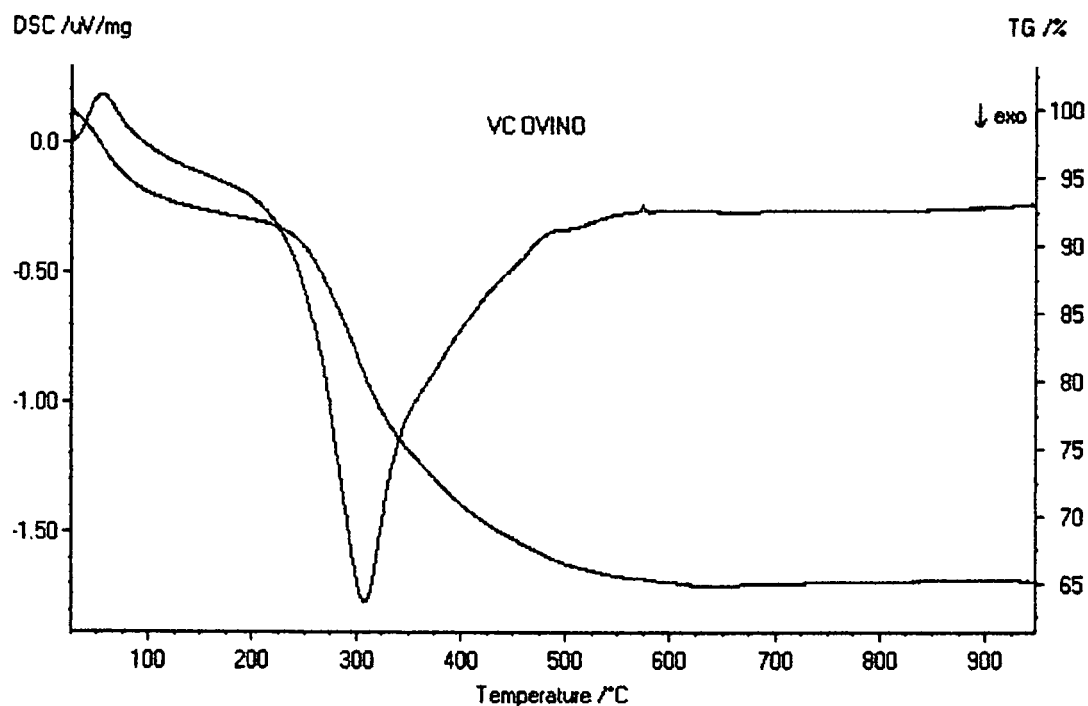


FIGURA 17: TERMOGRAMA DE VC DE OVINO

4.4 - Determinação de grupos ácidos (Acidez total, carboxílica e fenólica)

Os grupos COOH são particularmente importantes nas reações de troca de cátions e reações de quelação de metais (RASHID, 1985). São os grupos mais reativos e termolábeis nas moléculas húmicas (WILCKENS, 1997).

Os valores para acidez total, carboxílica e fenólica, foram calculados com base em matéria orgânica (Tab.11 e 12), evitando-se assim incluir as cinzas e a umidade na base de cálculo do teor de acidez. Todavia as amostras com elevado conteúdo em cinzas (Tab. 9; p. 42) podem possuir uma acidez inorgânica considerável que fica incluída na acidez total e na acidez fenólica, que é determinada por diferença. Por essa razão, os valores de acidez total e fenólica para a amostra de VCBO, por exemplo, com o mais elevado teor de cinzas (70,21%, Tab. 9) e para qual são observadas absorções nos espectros de IR das amostras de bovino relativos a grupos ν (SiO- H), (Fig.26; p. 63) que podem estar contribuindo para a acidez total (Tab. 11).

TABELA - 10: ANÁLISE DOS GRUPOS FUNCIONAIS ÁCIDOS E PODER REDUTOR DOS AH.

Amostra	A. total	ϕ -COOH	ϕ -OH	P R
AHBO	8,22	1,84	6,38	3,82
AHCA	5,29	1,54	3,75	3,50
AHCO	5,68	1,42	4,26	2,38
AHOV	8,20	1,58	6,62	4,43

Grupos ácidos em mmol H^+ / g M.O. (descontado os teores de umidade e cinzas).
 poder redutor em mmol ϕ -OH/g M.O. (descontado os teores de umidade e cinzas).

TABELA -11 ANÁLISE DOS GRUPOS FUNCIONAIS ÁCIDOS E PODER REDUTOR DOS VC.

Amostra	A. total	ϕ -COOH	ϕ -OH	P R
VCBO	17,47	0,73	16,74	8,97
VCCA	8,63	0,83	7,80	3,25
VCCO	8,92	0,95	7,97	4,48
VCOV	8,13	0,70	7,43	4,91

Grupos ácidos em mmol H^+ / g M.O. (descontado os teores de umidade e cinzas).

Poder redutor em mmol ϕ -OH/g M.O. (descontado os teores de umidade e cinzas).

TABELA -12 ANÁLISE DOS GRUPOS FUNCIONAIS ÁCIDOS PARA AH EXTRAÍDOS DO SOLO E DE MELANINAS DE ACTINOMICETOS.

Amostra	A. total	ϕ -COOH	ϕ -OH
AH solo	7,50	4,30	3,20
AH melanina	4,56	1,55	3,01

Fonte: Schnitzer, 1965; Paim et al., 1990.

Grupos ácidos em mmol H^+ / g M.O. (descontado os teores de umidade e cinzas).

A acidez total dos AH e VC é análoga a encontrada para alguns AH do solo (SCHNITZER et al., 1965; CHEN et al., 1977). Para a acidez carboxílica, os valores encontrados são mais baixos, ao contrário do que ocorre para acidez fenólica. Os baixos valores da acidez carboxílica, são comparáveis aqueles relatados para melaninas de fungos e actinomicetos (PAIM et al., 1990; GOMES et al., 1996) e estão de acordo com os baixos valores das razões E_4/E_6 (Tab. 8; p. 37) e razão O/C (Tab.5 e 6; p. 34) confirmando o baixo grau de humificação destas amostras. O aumento do teor de grupos COOH é consequência do processo de humificação, no qual, grupos metila substituintes aromáticos são oxidados a grupos carboxila (PAIM et al., 1990) O caráter ácido total das amostras de AHOV e AHBO é muito similar ao caráter ácido de AH do solo.

4.5- Determinação do poder redutor(PR)

Determinou-se o poder redutor das SH utilizando-se como titulante hexacianoferrato (III) de potássio (Tab. 13 e 14; p. 54). A oxidação das SH está relacionada com as estruturas orto e para difenólicas.

A literatura registra diversas experiências de demonstração da capacidade redutora das substâncias húmicas frente a íons metálicos (SKOGERBOE et al. 1981.; SZILZGY et al. 1971).

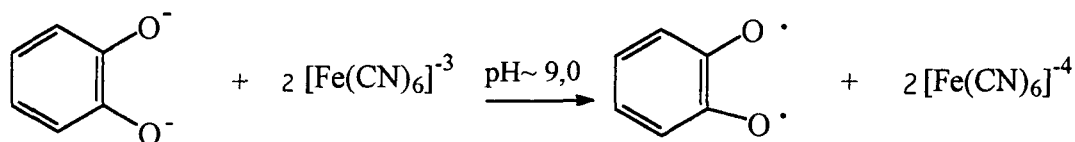
HELBURN et al., 1994, estudaram a quantidade de polifenóis presentes em amostras de AH por titulação potenciométrica em pH alcalino. O método descrito para o poder redutor mostra que os AH se comportam como uma substância pura. Estes autores também apontam a importância da escolha do pH apropriado, para que outros constituintes dos AH (como por exemplo açúcares) não interfiram na determinação e, ao mesmo tempo, os polifenóis presentes estejam parcialmente dissociados.

O hexacianoferrato (III) ($E_o = +360\text{mV}$) é um agente oxidante comum, que tem sido aplicado para o estudo das propriedades redox de proteínas, carboidratos, ligninas e outros materiais fenólicos naturais. (HELBURN et al., 1994) a partir de alguns experimentos, determinou que os valores encontrados para amostras de AHs do solo variam de 1,58 a 1,73 mmol/g de M.O, em pH 9,0.

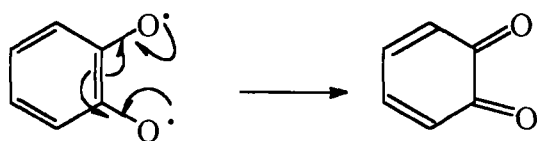
Os valores do poder redutor determinado para AH e VC neste trabalho são maiores, sugerindo que a M.O, dessas amostras é mais recente, ou menos humificada (SZILZGY, 1971).

REAÇÕES DE REDUÇÃO DO HEXACIANOFERATO (III) POR O- e P-DIFENÓIS.

a) Orto di-hidróxi-benzeno

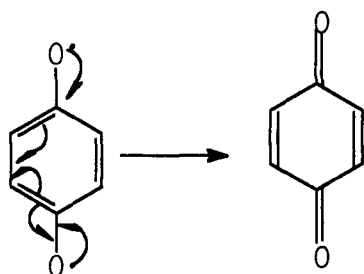
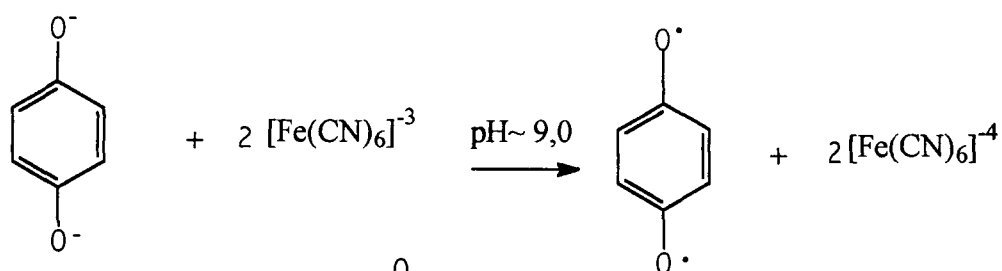


Semiquinona



orto quinona

b) Para di-hidróxi-benzeno



para quinona

O poder redutor para AHCA está muito próximo de sua acidez fenólica que por sua vez é a mais baixa dentre os AH estudados. Isto indica que a maior parte dos grupos fenólicos na amostra de AHCA estão como orto e para difenóis. As amostras de AHBO e AHOV apresentam poderes redutores próximos, o que já ocorria com as acidez fenólicas. Isto leva também a que suas razões entre orto/para polifenóis sejam semelhantes: AHBO= 59,87; AHOV=66,92%. A razão de orto/para difenóis é determinada em relação a acidez fenólica. Os dados obtidos na determinação do PR são mostrados nas Tabelas 13 e 14 e na seqüência são mostrados os gráficos (Figs. 18 a 25; p.55 a 58).

TABELA - 13: ACIDEZ FENÓLICA, PR E RAZÃO ENTRE O/P DIFENÓIS DE AH.

Amostra	ϕ -OH	P R	% O- e p-difenóis
AHBO	6,38	3,82	59,87%
AHCA	3,75	3,50	93,33%
AHCO	4,26	2,38	55,86%
AHOV	6,62	4,43	66,92%

acidez fenólica em mmol H^+ / g M.O. (descontado os teores de umidade e cinzas).

poder redutor em mmol ϕ -OH/g M.O. (descontado os teores de umidade e cinzas).

razão monofenóis/difenóis (%).

TABELA -14 ACIDEZ FENÓLICA, PR E RAZÃO ENTRE O/P DIFENÓIS DE VC.

Amostra	ϕ -OH*	P R	% O- e p-difenóis
VCBO	16,74	8,97	53,58%
VCCA	7,80	3,25	41,67%
VCCO	7,97	4,48	56,21%
VCOV	7,43	4,91	66,08%

acidez fenólica em mmol H^+ / g M.O. (descontado os teores de umidade e cinzas).

Poder redutor em mmol ϕ -OH/g M.O. (descontado os teores de umidade e cinzas).

razão monofenóis/difenóis (%)

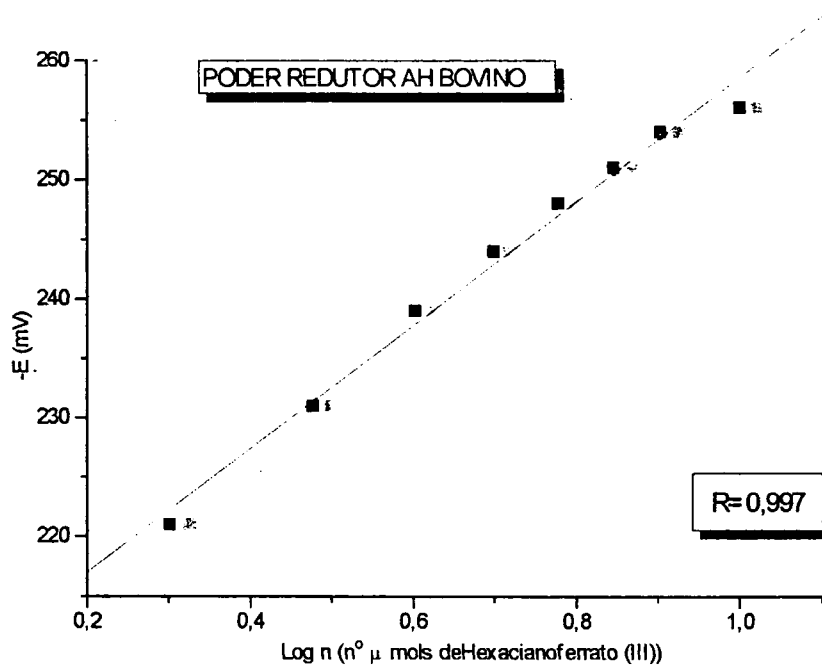


FIGURA 18: GRÁFICO DO PODER REDUTOR DE AH BOVINO.

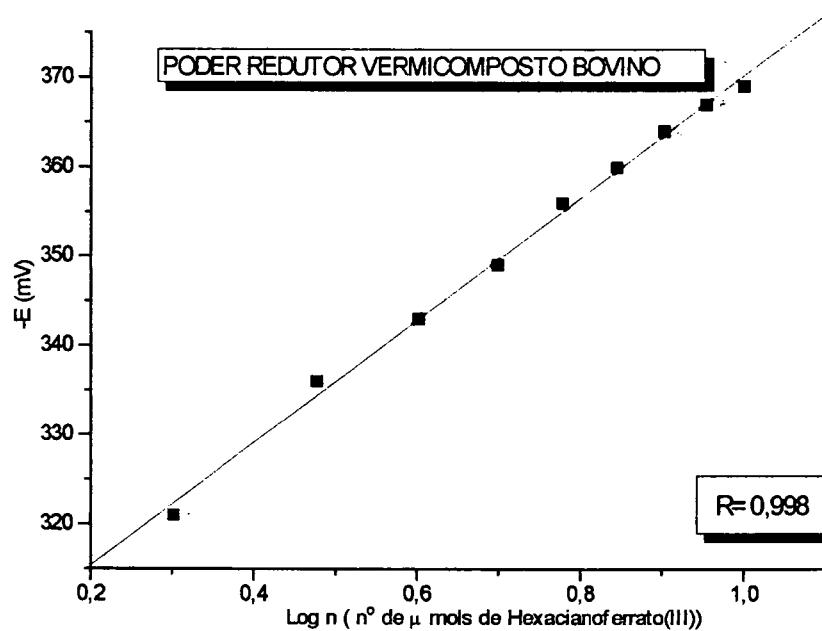


FIGURA 19: GRÁFICO DO PODER REDUTOR DE VC BOVINO.

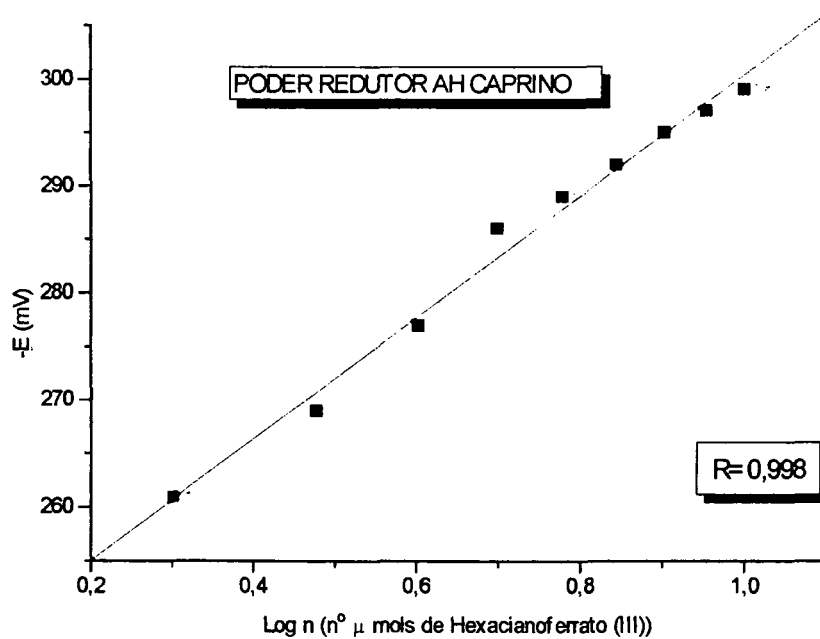


FIGURA 20: GRÁFICO DO PODER REDUTOR DE AH CAPRINO.

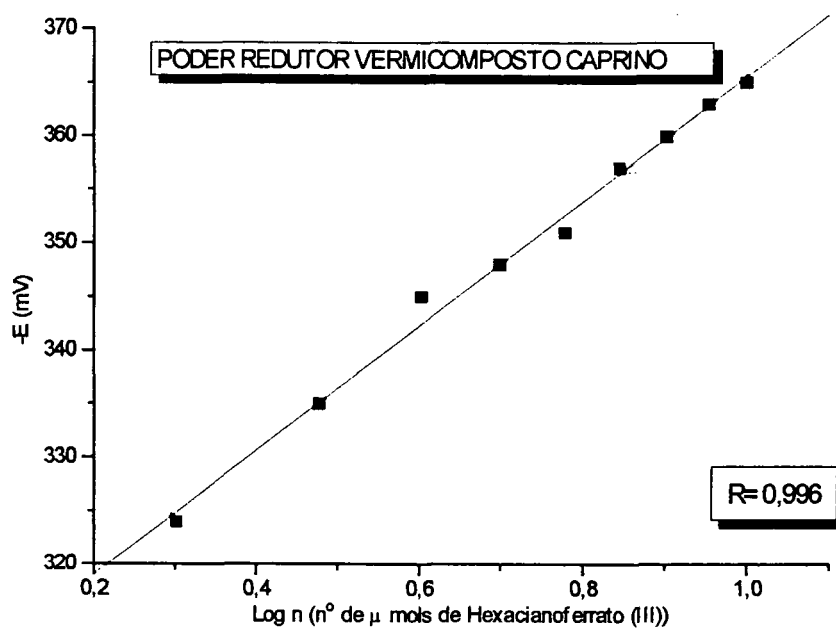


FIGURA 21: GRÁFICO DO PODER REDUTOR DE VC CAPRINO.

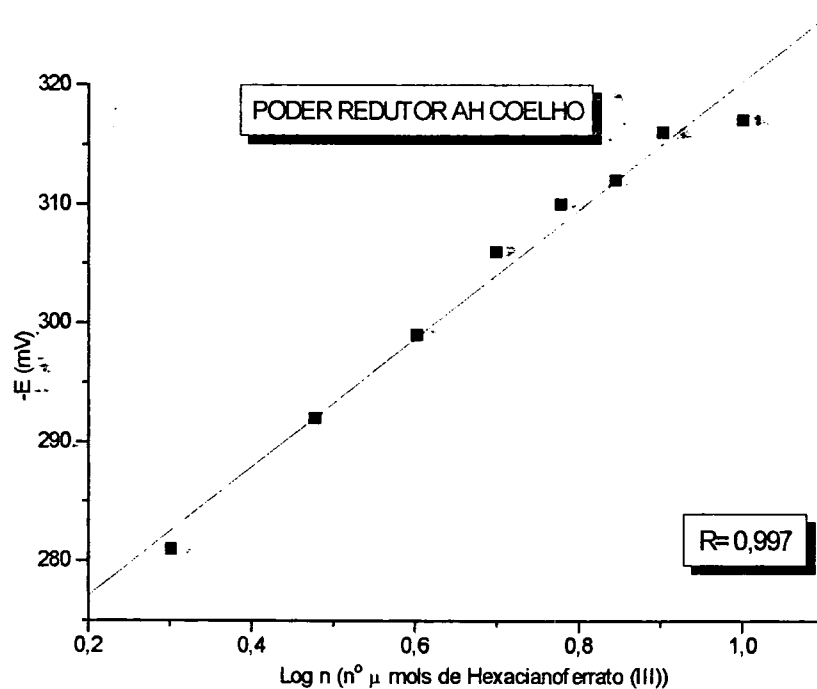


FIGURA 22: GRÁFICO DO PODER REDUTOR AH DE COELHO.

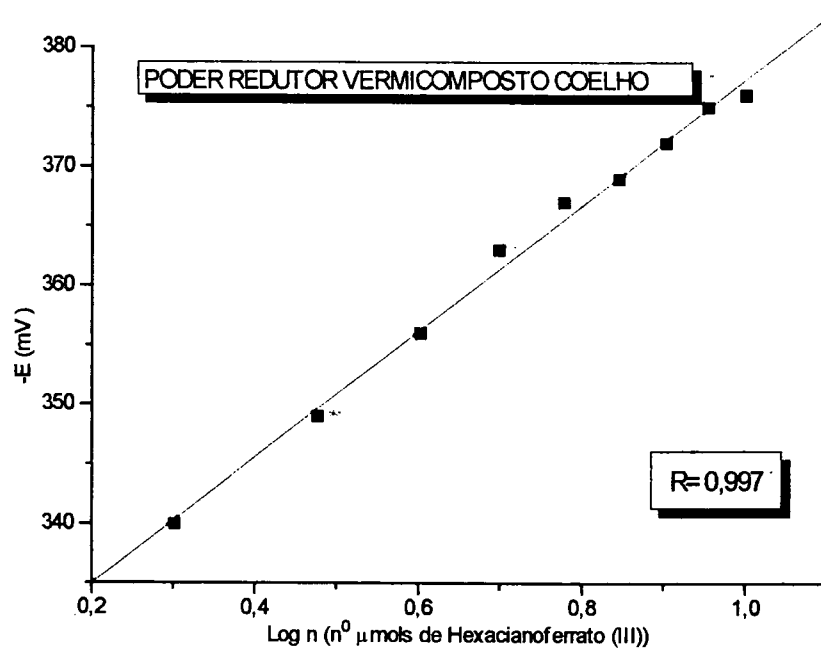


FIGURA 23: GRÁFICO DO PODER REDUTOR DE VC DE COELHO.

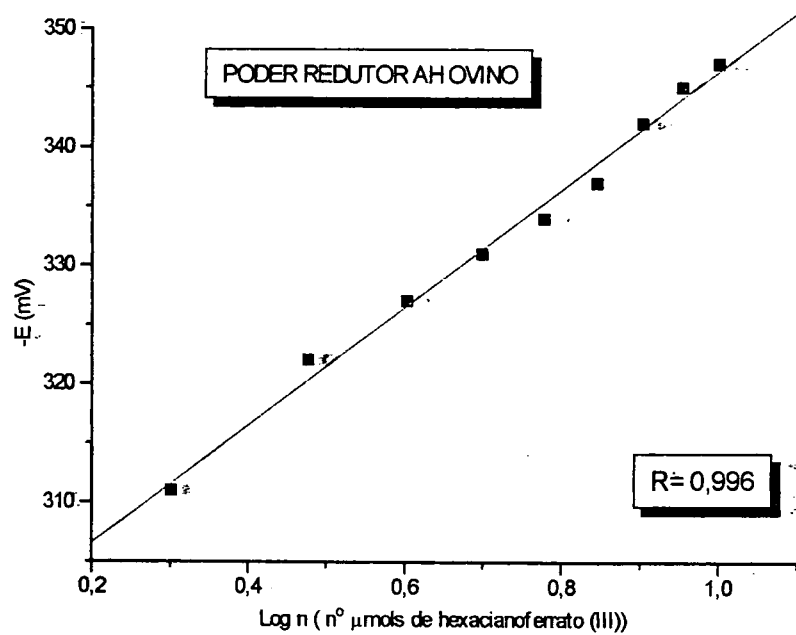


FIGURA 24: GRÁFICO DO PODER REDUTOR DE AH DE OVINO.

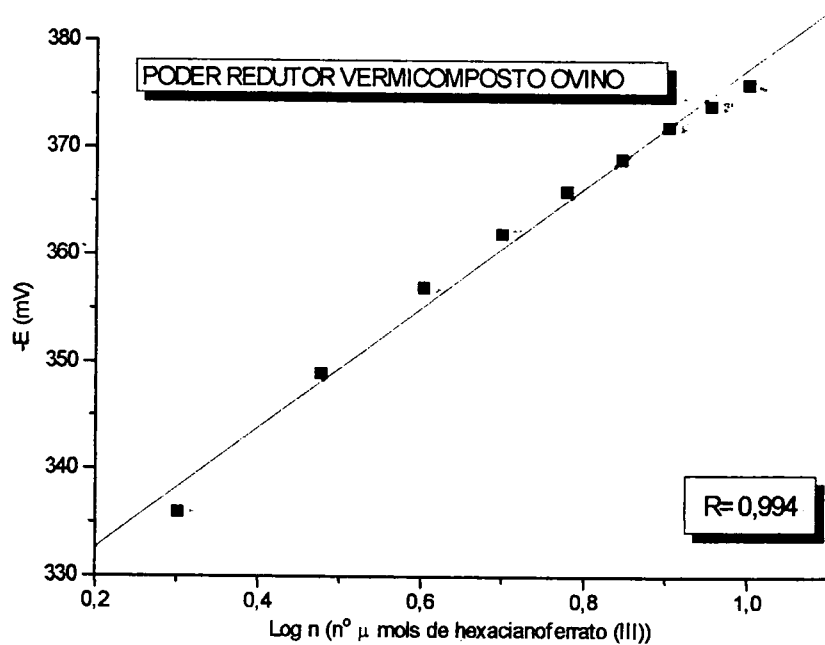


FIGURA 25: GRÁFICO DO PODER REDUTOR DE VC DE OVINO.

4.6- Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier(FTIR)

As análise de IR têm sido tradicionalmente usada, para identificar grupos funcionais em SH, como ácidos carboxílicos, aminas, amidas, grupos alifáticos, grupos hidroxilas e outros (MARTIN-NETO et al. , 1994 a).

As variações associadas com as absorções de IR originárias desses grupos indicam diferenciações entre compostos húmicos e o envolvimento de grupos funcionais em reações com metais, argilas e pesticidas (SENESI et al., 1989.; MARTIN-NETO et al. ,1994 a).

Os espectros de IR dos AH e VC estudados nesta tese são similares, porém, uma melhor resolução de bandas é observada para as amostras dos AH. Apenas uma diferença marcante nas duas séries de espectros é a banda menos intensa e melhor resolvida na região de $1130-1000\text{ cm}^{-1}$ dos espectros de AH (Figs. 26 e 27; p.63) que engloba a vibração $\nu(\text{Si-O})$ da matéria inorgânica, que é mais abundante nos VC (Fig. 27: p. 63).

A presença de uma banda fraca em 3685 cm^{-1} nos espectros de VCBO e AHBO que pode ser atribuída a vibrações O-H de grupos $\nu(\text{SiO-H})$, pode ser uma das razões da elevada acidez total nas amostras de bovino, concordando também com os altos teores de cinzas nestas amostras.

Todos os espectros mostram uma forte absorção centrada em $3426-3409\text{ cm}^{-1}$, atribuída a $\nu(\text{O-H})$ de grupos alcoólicos e fenólicos. Os ombros desta banda em $3287-3241\text{ cm}^{-1}$, e a sua largura podem ser atribuídos a $\nu(\text{N-H})$, de amidas, aminas e/ou

$\nu(\text{O-H})$ de grupos fenólicos com pontes de hidrogênio. Estes dados são coerentes com os altos teores de nitrogênio e de grupos fenólicos

Todos os espectros apresentam bandas na região de 2900 cm^{-1} , atribuídas a $\nu(\text{C-H})$ alifáticos.

A banda na região de $1740\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ é análoga àquela encontrada nos espectros de IR de melaninas de fungos e de actinomicetos (PAIM et al., 1990; GOMES, et al., 1996). Todos os espectros dos AH mostram duas sobreposições de bandas centradas em 1720 cm^{-1} de intensidade média e 1645 cm^{-1} , de intensidade forte. A primeira absorção é atribuída $\nu_{\text{as}}(\text{OCO})$ de ésteres, e ácidos carboxílicos ou $\nu(\text{C=O})$ de cetonas, e a segunda banda é atribuída a $\nu_{\text{as}}(\text{OCO})$ de carboxilatos possivelmente coordenados com metais, a $\nu(\text{C=O})$ com pontes de H ou $\nu(\text{C=O})$ de grupos amida (banda de amida I). Estas duas bandas apresentam-se menos intensas mas com a mesma relação de intensidades nos espectros de FTIR dos VC.

A baixa intensidade da banda em 1720 cm^{-1} nos espectros de todas as amostras está em concordância com a baixa acidez carboxílica das amostras determinadas por análise químicas. No caso dos AH a banda em 1720 cm^{-1} é um pouco mais intensa, ainda em acordo com os valores de COOH determinados por análise química (Tab.10; p. 51)

A larga absorção centrada a 1645 cm^{-1} (Figs. 26 e 27; p. 63) aparece em todos os espectros, desdobrada em três componentes, indicando diferentes tipos de vibrações. A presença de complexos carboxilatos de metais (ferro, cobre) está evidente nos estudos de RPE destas SH (item 4.9; p.75). A existência de grupos amida nas amostras está coerente com seu alto teor de nitrogênio e esta em concordância

com a interpretação dos espectros de IR de melaninas de fungos e actinomicetos (PAIM et al., 1990; GOMES et al., 1996). A presença de grupos (C=O) com ligações de hidrogênio está coerente com o teor fenólico das amostras indicando a existência de grupos fenólicos com substituintes carboxílicos em posição orto.

A banda de absorção em 1645 cm^{-1} também mostra um ombro em 1614 cm^{-1} para todos os espectros, o qual poderia ser atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ de grupos heterocíclicos nitrogenados coerente com a presença de estruturas porfirínicas conforme determinado por espectroscopia de RPE..

Uma absorção que aparece em todos os casos a $1543\text{ -}1540\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída a vibração $\nu(\text{C}=\text{C})$ de compostos aromáticos.

Os espectros de IV dos AHs e VCs são dominados, com exceção das amostras de bovino, (Figs. 26 e 27: p. 63) por uma pronunciada banda em $\sim 1370\text{ cm}^{-1}$ atribuída a vibração $\delta(\text{C-H})$, de grupos alifáticos, baseada no estudo conjunto com $^1\text{H-RMN}$ (item 4.7; p. 64).

Os espectros de AHBO e VCBO (Figs. 26 e 27: p. 63) mostram, nesta região, bandas fracas que podem ser atribuídas a grupos $\nu(\text{C-O})$ de fenol ou $\nu_s(\text{OCO})$ de grupos carboxilatos coordenados, que se superpõem a banda de $\delta(\text{C-H})$.

A banda na região de $1125\text{-}995\text{ cm}^{-1}$, atribuída a vibrações (C-O) de carboidratos, e/ou Si-O de argilas está um pouco mais intensa e menos resolvida nos espectros de VC, quando comparados com os AH.

A existência de carboidratos nestas amostras é sugerida por uma banda $1036\text{ -}1028\text{ cm}^{-1}$ que aparece em todos os casos (DEIANA et al., 1990) embora a atribuição não seja evidente devida a larga banda $\nu(\text{Si-O})$ que aparece na mesma região.

Os espectros de IR estão coerentes com o elevado teor fenólico, com a baixa acidez carboxílica e o alto teor de nitrogênio das amostras. O nitrogênio parece estar fazendo parte de grupos amida secundária e talvez de heterocíclicos aromáticos. Os elevados teores de cinzas encontrados para a amostra de VCBO está em concordância com a banda no espectro de IR na região de 1130-1000 cm^{-1} atribuída também a vibração $\nu(\text{Si-O})$ da matéria inorgânica, assim como as bandas em 3420 cm^{-1} atribuída a vibrações $\nu(\text{SiO-H})$, conforme já citado.

TABELA -15: PRINCIPAIS REGIÕES DE BANDAS DE ABSORÇÃO ENCONTRADAS NOS ESPECTROS DE FTIR DAS AMOSTRAS DE AH E VC.

Região ν (cm^{-1})	Atribuições	Comentários
3420 cm^{-1} , banda larga e intensa	$\nu(\text{OH})$ e $\nu(\text{NH})$	coerente com grupos fenólicos e o alto teor de N.
2927 cm^{-1}	$\nu(\text{C-H})$ alifático	
1740-1724 cm^{-1} fraca intensidade	$\nu_{\text{as}}(\text{OCO})$ de ác. Carboxílicos, ésteres $\nu(\text{C=O})$ de cetonas.	Coerente com o baixo teor de acidez carboxílica.
1651-1635 cm^{-1} , larga e intensa	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ de carboxilatos . $\nu(\text{C=O})$ ligação de H Banda de amida I C=C ou C=N	compostos de coordenação identificados por EPR. Coerente com ac.fenólica. coerente com alto %N, presença de peptídeos
1545-1543 cm^{-1}	banda de amida II $\nu(\text{C=C})$ de compostos aromáticos	coerente com alto %N presença de peptídeos coerente com alto teor aromático
1385-1383 cm^{-1} aguda	$\delta(\text{C-H}_2)$ $\nu(\text{C-O})$ fenol $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ de carboxilatos coordenados.	Ausente em AH BO, coerente com ^1H - NMR
1125-995 cm^{-1} banda larga	$\nu(\text{Si-O})$ e $\nu(\text{C-O})$ polissacarídeos	mais desdobrada e menos intensa em AH que em VC.

(Fonte SILVERSTEIN et al., 1967)

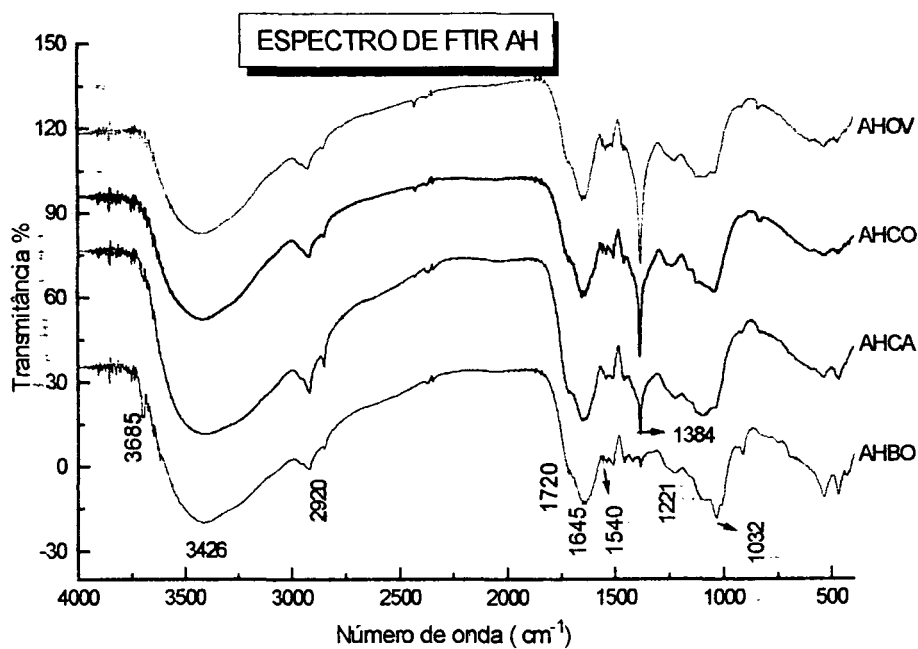


FIGURA 26: ESPECTRO DE FTIR SOBREPOSTO DE AH. (pastilhas de KBr 1%)

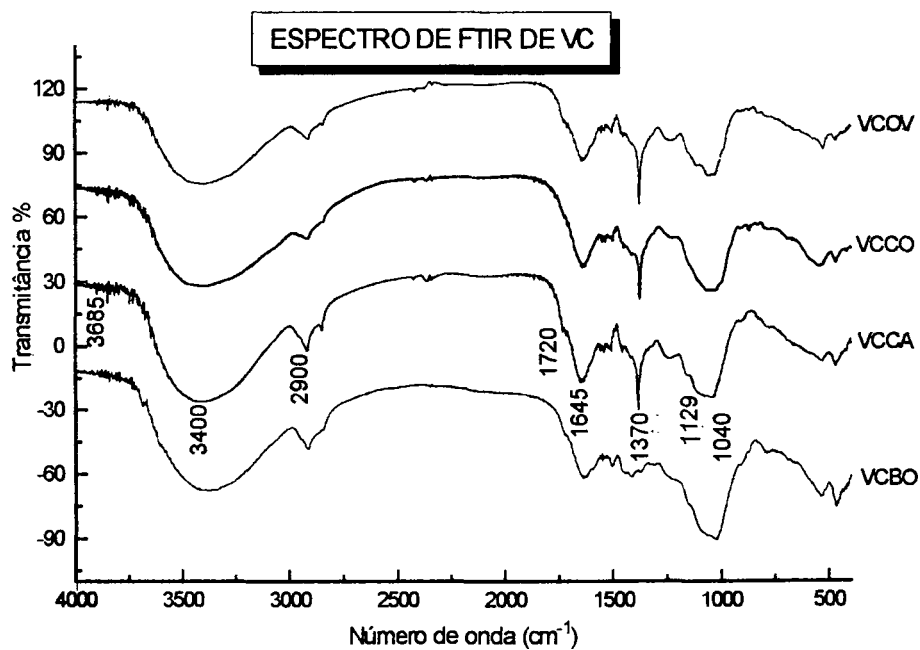


FIGURA 27: ESPECTRO DE FTIR SOBREPOSTO DE VC. (pastilhas de KBr 1%).

4.7 Espectroscopia de ^1H -NMR

Os espectros de ^1H -RMN dos AH (Tab.16, Figs. 28 a 31; p. 68 a 71) estudados apresentaram basicamente os mesmos sinais, variando a intensidade relativa dos mesmos. Com base na área dos sinais, a porcentagem de prótons na região de 7,4-6,1 ppm com respeito ao total é ~20% para AHBO, AHCA e AHCO (Figs. 28, 29 e 30; p. 69 a 71). Este valor está de acordo com o encontrado RUGGIERO et al., 1980. para AH com alto teor de grupos aromático e anéis muito substituídos assim como o alto grau de conjugação. É preciso lembrar que nos espectros em NaOD a intensidade dos sinais dos H aromáticos diminui em relação a outros solventes, como por exemplo DMSO- d_6 porque pode existir uma troca de H aromático pelo deutério devido a tautomeria cetoenólica (RUGGIERO et al., 1980). Para o AHOV (Fig. 31 p. 72) o teor de H aromáticos é menor (~13%) devido a enorme intensidade dos sinais a δ 3,62(q) e 1,14(t) ppm.

As atribuições foram feitas com base na escassa literatura de análise espectroscópica de ^1H -RMN de SH e a literatura geral de ressonância de próton (GUNTHER, 1996; PRETSCH et al., 1980).

Todos os espectros apresentam um singlete a δ 8,4 ppm, mais agudo que os sinais dos prótons aromáticos. Este sinal pode ser atribuído a ϕ -OH, provavelmente unidos por ligações de H a grupos carbonilas em posição orto. Esta interpretação está coerente com a elevada acidez fenólica dos AH e com a banda de IR em 1645cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$) unidos por pontes de hidrogênio). Existem também outras possibilidades de atribuição do singlete: a presença de íons formiato (WILSON et al., 1978) ou prótons

centrais de estruturas antracênicas (SILVERSTEIN, 1967). Também pode ser atribuído a prótons de heterocíclicos nitrogenados de anéis de 6 membros do tipo quinoleína, isoquinoleína tem um outro singlete muito fraco a δ 9,1 e 9,3 ppm respectivamente atribuíveis a outros H destes heterocíclicos, quinoxalina, piridina, pirimidina e pirazina.

TABELA -16: PARÂMETROS DE ^1H -RMN PARA AMOSTRAS DE AH.

sinal (δ ppm)	Atribuições	comentários
8,4 s	ϕ -OH associado à C=O em orto. Heterocíclicos aromáticos nitrogenados	coerente com acidez fenólica e a banda de IR a 1645cm^{-1} coerente com alto %N e com a existência de compostos de coordenação (RPE) Pág.74
7,37 d, (J=8Hz)	H aromáticos de anéis substituídos por grupos COOH ou éster.	Coerente com os espectros de IVTF.
6,60 d(J=8Hz)	H de anéis aromáticos substituídos por grupos amina ou difenóis.	coerente com o teor fenólico, (Tab. 9) e %N (Tab.5) e os espectros de IVTF (Figs.26 e 27)
7,30 d; (j = 16,0); 6,20 d (j = 16,0)	H - Trans. Dupla ligação conjugadas.	coerente com o baixo valor da razão E_4/E_6 .
7,10 s; 6,93 s; 6,50 m	H heterocíclicos (pirrol e indol)	coerente com espectros de RPE e com alto teor de N (Tab. 5)
3,62q, 1,14t	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-NHCO-R}$ $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-R}$	A intensidade diminui na ordem AHOV, AHCO, AHCA AHBO.
4,1 - 3,72	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)-O-C=O(R)}$ $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)-OR}$	3 singletes largos
3,32	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)-NHCOR}$ $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)-O-R}$	1 singlete agudo
2,15 - 1,88	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)-COOR}$ $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)-CONR}_2$	3 singletes largos
1,30	$\text{-CH}_2\text{-}$ alifático	singlete largo
0,87	$\text{CH}_3\text{-}$ alifático	singlete largo

Na região de 7,4- 6,1 ppm os espectros apresentam vários grupos de sinais sobrepostos a sinais de hidrogênios aromáticos não resolvidos. O espectro é mais nítido nesta região para a amostra de AHCA (Fig. 37; p. 70) sendo que o AHBO (Fig. 36; p. 69) apresenta mais sinais.

O dublete a δ 7,37 pode ser atribuído a prótons aromáticos de anéis com substituintes do tipo C = C, orto - O - C - OR ou meta - COOH ou - COOR.

O dublete a δ 6,60 ppm ($J=8$ Hz) pode ser atribuído a ressonância de prótons de anéis aromáticos substituídos por grupos orto/para amina, ou H aromáticos de grupos difenólicos. Outros sinais na região 7,1- 6,2 ppm (ausente em AHCA) (Fig. 37; p. 70) podem ser devidos a ressonância de H heterocíclicos, sobretudo do tipo pirrol ou indol.

Os dubletes centrados a δ 7,29 d, 6,19 d ($J=16$ Hz) parecem estar associados, devido a forma dos sinais nos espectros. Podem ser atribuídos a H trans de duplas ligações conjugadas com grupos C(=O)R (R= alquil ou éter), sendo estas cadeias substituintes de grupos pirrólicos (BREITMAIER, 1993).

Do estudo da região δ (7,4-6,1 ppm) do espectro pode-se deduzir a presença nestes AH de fenóis e de difenóis em concordância com o elevado teor de acidez fenólica e do poder redutor (Tab.13, p. 55). Também foi observada a presença de cadeias de duplas ligações conjugadas em concordância com a baixa razão E_4/E_6 destas amostras (Tab. 8; p. 37), assim como a existência de heterocíclicos nitrogenados, confirmando as deduções das análises térmicas (item 4.3; p. 43).

Os sinais a δ 3,62 (q) e 1,14 (t) correspondem a um grupo etila unido a um átomo eletronegativo. Pela posição dos sinais os grupos mais prováveis são: Et-NHCO-R, ou Et-OR (R= alquila). Os sinais são extremamente intensos em AHOV e a

intensidade vai diminuindo na ordem AHOV>AHCO>AHCA>AHBO. No caso do AHBO o sinal é quase imperceptível. Estes resultados favorecem a possibilidade de que a banda a $\sim 1370\text{ cm}^{-1}$ em espectroscopia de IR (Figs. 26; p. 64) seja atribuída a um $\delta(\text{C-H})$, alifático, visto que no AHBO esta banda não aparece.

Nas regiões de δ 4,1-3,7 ppm aparecem 3 singletes largos, que podem ser atribuídos as ressonâncias de metilas ou metilenos unidos a grupos $-\text{O}-\text{CO}-\text{R}$ ou $\text{O}-\text{R}$ ($\text{R} = \text{alquil}; \phi$).

O singlete a δ 3,32 ppm pode ser atribuído a grupos $-\text{CH}_3$ ou $-\text{CH}_2$ ligados a grupos $-\text{OR}$ ou $-\text{NHCOR}$.

A opção de ésteres e amidas parece bastante provável, por que os três sinais que aparecem na região δ 2,15-1,88 ppm, podem ser atribuídos a ressonância de grupos CH_3 ou $-\text{CH}_2-$ unidos a grupos $-\text{CO}-\text{OR}$ ou $\text{CO}-\text{NR}_2$. Também nesta região podem aparecer sinais atribuíveis a grupos $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{R}$, $\text{CH}_3-\phi$, CH_3-NR_2 , $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ ou $-\text{C}=\text{CH}_2$.

Finalmente, os sinais largos a δ 1,30 ppm podem ser atribuídos a δ ($-\text{CH}_2-$) alifáticos, também pode conter sinais devido a grupos, $\text{CH}_3-\text{C}=\text{C}$, $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{R}$ ($\text{R} = \text{H}$, alquila; ϕ ; $\text{CO}-\text{R}$, $\text{C}-\text{O}-\phi$) ou a $\text{R}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NRR}'$ ($\text{NRR}' = \text{amina primária, secundária ou terciária}$). O sinal largo a δ 0,87 ppm engloba os $-\text{CH}_3$ alifáticos.

O estudo da região não aromática parece indicar um claro predomínio de grupos éter, amida e/ou éster. A presença de grupos amidas, provavelmente de cadeias peptídicas, está coerente com o alto teor de nitrogênio nestes ácidos húmicos.

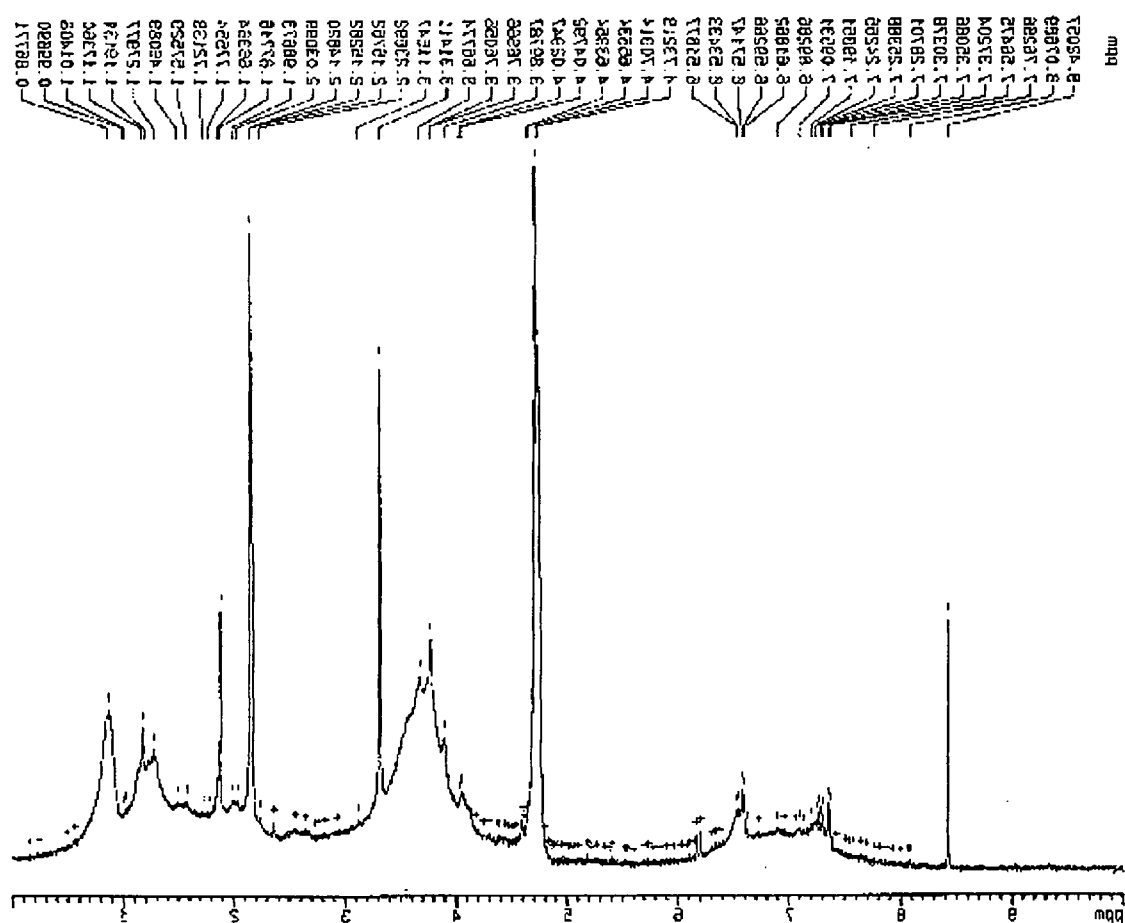


FIGURA 28: ESPECTRO DE ^1H -RMN DE AH BOVINO (solução de 0,3 mol/L de NaOD/D₂O)

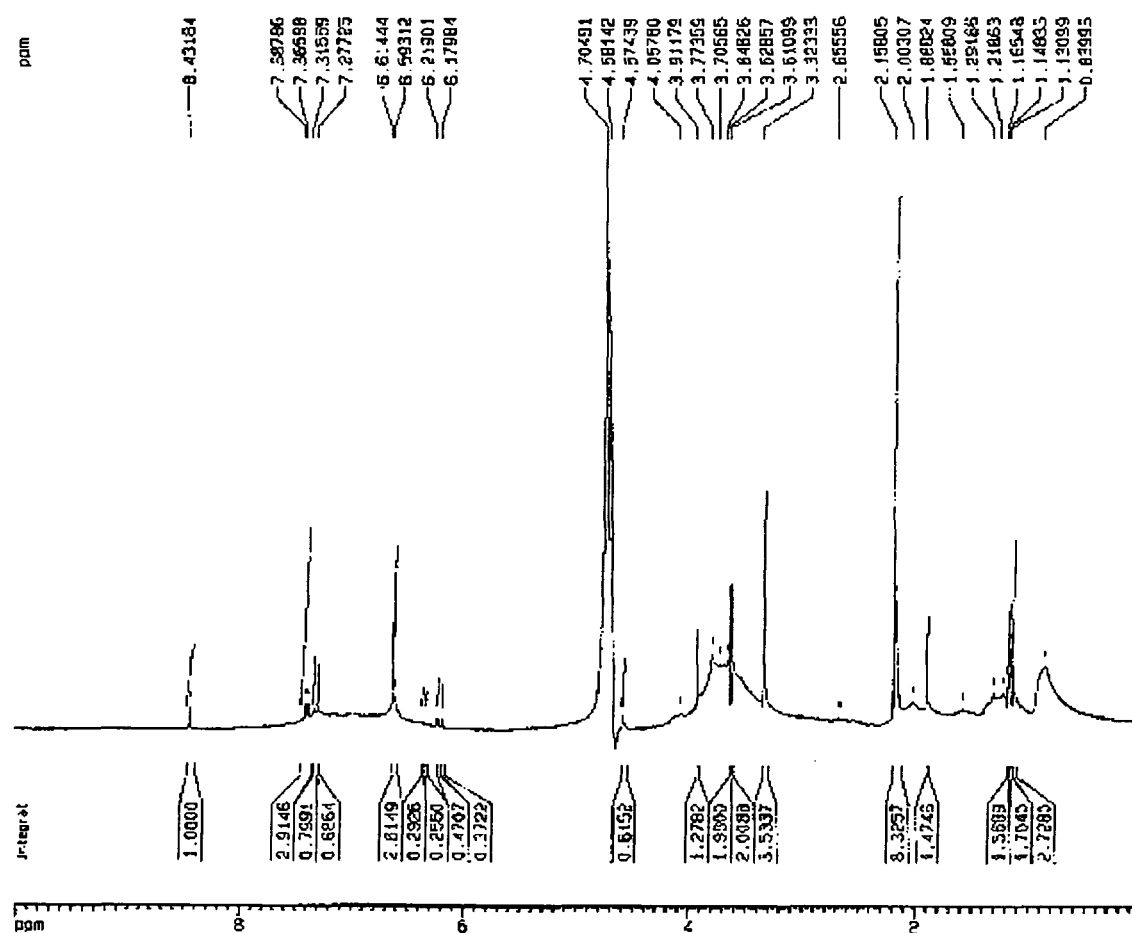


FIGURA 29: ESPECTRO DE ¹H-RMN DE AH DE CAPRINO (solução de 0,3 mol/L de NaOD/D₂O)

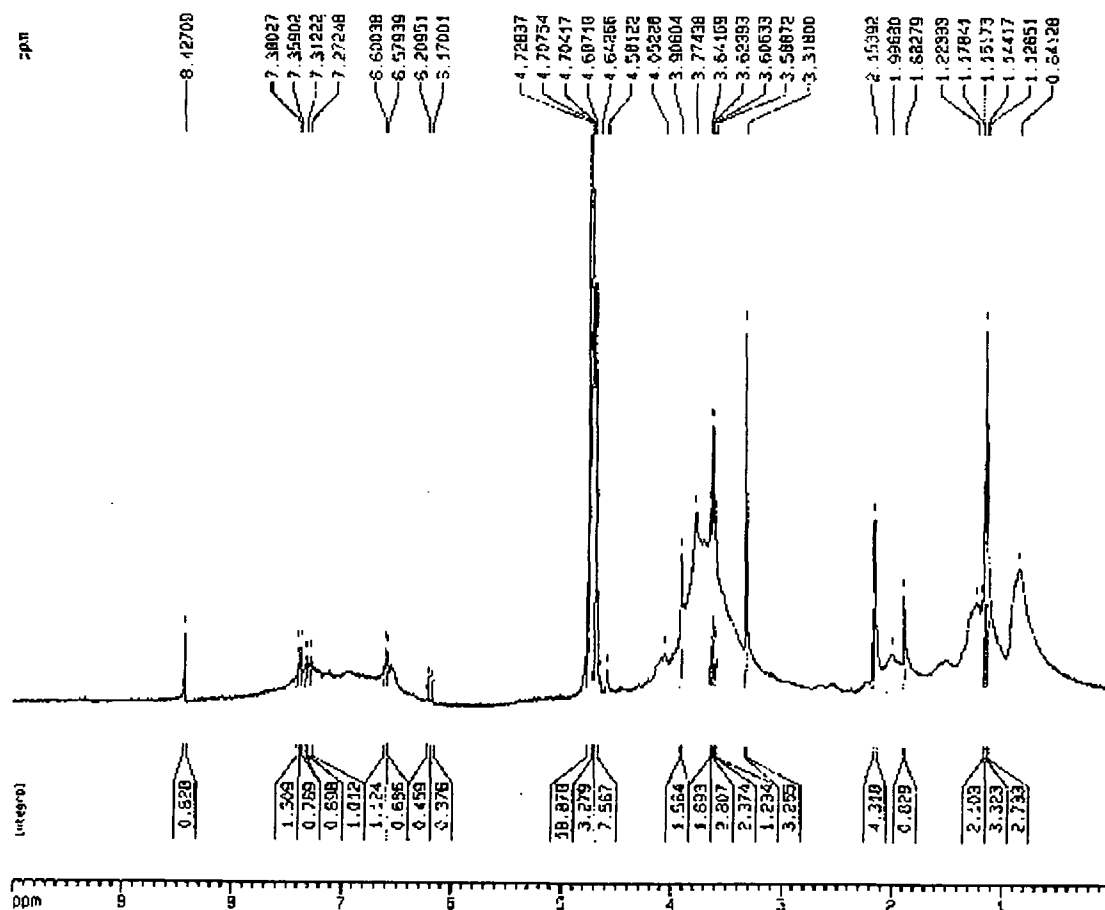


FIGURA 30: ESPECTRO DE ^1H -RMN DE AH DE COELHO (solução de 0,3 mol/L de NaOD/D₂O)

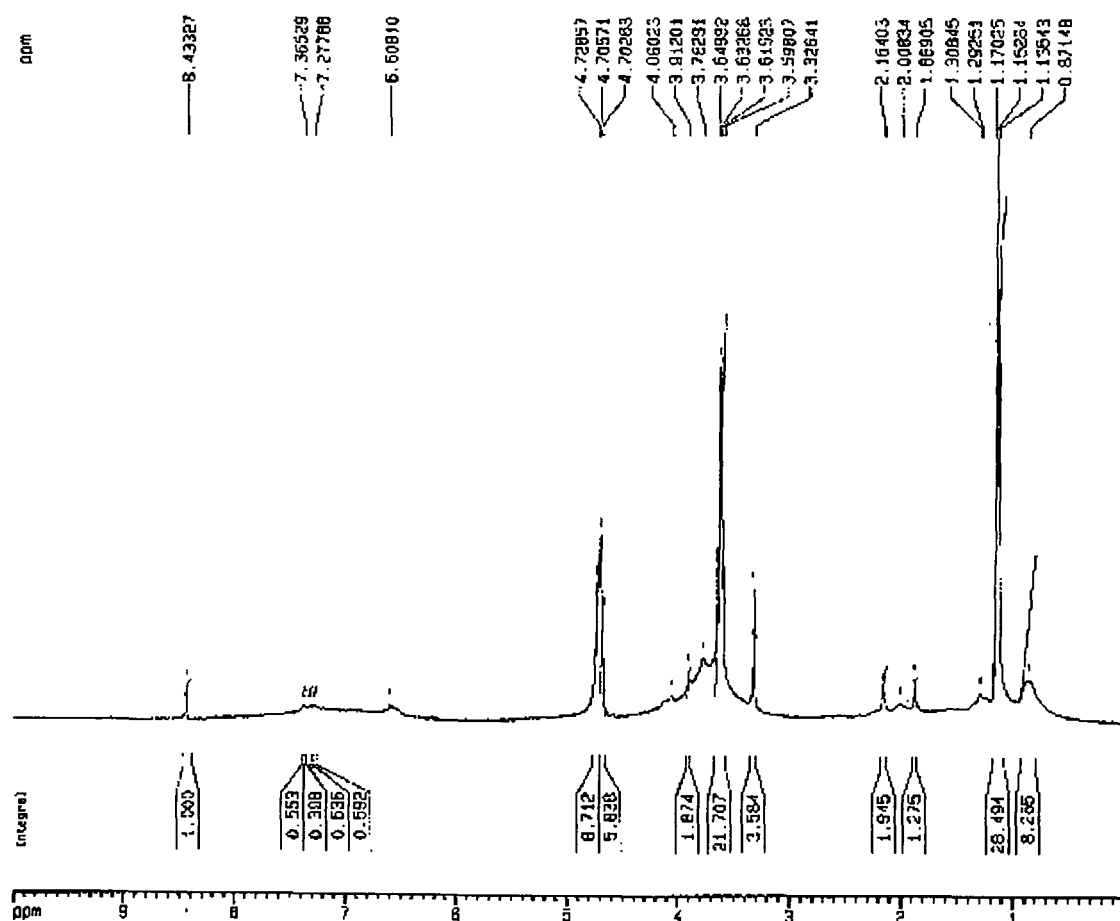


FIGURA 31: ESPECTRO DE ^1H -RMN DE AH DE OVINO (solução de 0,3 mol/L de NaOD/D₂O).

4.8- Espectrometria de absorção atômica (EAA) - Análise de metais

A interação de compostos húmicos com metais é de grande importância para o meio ambiente, pois influencia o transporte de micronutrientes do solo para as plantas e a mobilização de elementos tóxicos no solo e nas águas. Seu estudo tem crescido nos últimos anos, principalmente nos estudos do controle ambiental (MANGRICH, 1997).

Nas Tabelas 17 e 18 são apresentados os teores de metais nos AH e VC, determinados por EAA:

TABELA - 17: ANÁLISE DE METAIS DE AH E VC

Amostras	Co mg/L	Cu mg/L	Mn mg/L	Fe mg/L
AHBO	9,25	153,46	400	14.400
AHCA	3,07	62,14	1800	2900
AHCO	7,18	225,97	700	4300
AHOV	9,51	66,19	700	2800
VCBO	7,52	24,81	2300	15.700
VCCA	4,42	28,30	3700	3700
VCCO	11,63	69,29	700	8900
VCOV	8,75	42,12	2700	5300

AH não Ressolubilizados (AH)

TABELA - 18: ANALISE DE METAIS DE AHr.*

Amostras	Co mg/L	Cu mg/L	Mn mg/L	Fe mg/L
AHBO	4,00	97,39	500	11.300
AHCA	0,20	68,16	200	2300
AHCO	7,99	289,52	200	2900
AHOV	5,54	96,47	400	11.000

*AH Ressolubilizados (AHr)

Com a finalidade de se interpretar os estudos de RPE trabalhou-se aqui e no item referente aquela técnica também com amostras dos mesmos AH porém, ressolubilizados e reprecipitados por mais duas vezes (item 3.2). Estas amostras são chamadas de AHr.

Os VCs possuem em geral teores de Mn, Fe e Co maiores e teores de Cu menores que os correspondente AH e AHr (Tab. 17 e 18).

Depois do processo de extração tanto os de AHr quanto os AH ficam mais enriquecidas em cobre quando comparados com as amostras dos respectivos vermicompostos. O cobre deve estar fazendo parte de compostos insolúveis em meio ácido e resistentes a hidrólise, sugerindo a presença pelo menos parcialmente de compostos de coordenação bastante estáveis, como complexos de Cu-porfirina (MANGRICH, 1997).

O teor de Mn é bem mais baixo nos AH e AHr do que nos VC. Normalmente a maior parte do manganês constitui-se de compostos solúveis e/ou facilmente hidrolisáveis. Os seus complexos são no geral de esfera externa (ver os dados de RPE). Quando são comparadas às amostras de AH com AHr, estas últimas têm os menores teores de manganês, exceto para o AHBO na qual o AH ressolubilizado apresenta maior teor de manganês que o AH.

Em geral o teor de cobalto é baixo para as amostras de AH. Quando os VC são submetidos a um único processo de extração (Tab. 17) se observam-se comportamentos diferentes. Os AHOV e AHBO são mais ricos em cobalto do que os respectivos vermicompostos. Observa-se o contrário para os AHCA e AHCO que tem menores teores de cobalto que os VC.

No geral os teores de ferro são relativamente altos em todas as amostras. Há uma diminuição nesses teores quando passa dos VC para os AH e destes para os AHr. A exceção está na amostra de AHr-OV que apresentou estranhamente teor de ferro maior que no próprio VC.

4.9- Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

A espectroscopia de RPE produz informações a respeito dos íons metálicos, seus estados de oxidação e de spin e o sítio de complexação ao qual estão ligados (MANGRICH, 1993). Vários trabalhos da literatura indicam que o íon Mn^{2+} está ligado aos grupos funcionais oxigenados dos ácidos húmicos como um complexo de esfera externa. Desse modo, o Mn^{2+} deve ser mais móvel e trocável. (MCBRIDE, 1978). Em relação ao cobre, existem relatos de formação de quelatos, com grupos ligantes oxigenados e nitrogenados (GOODMAN, & CHESHIRE, 1973; MCBRIDE, 1978).

Os trabalhos de MCBRIDE (1978) confirmaram a existência de um complexo de esfera externa de Mn^{2+} , e mostraram que o Cu^{2+} e VO^{2+} estão fortemente imobilizados nos ácidos húmicos, por ligações aos oxigênios de grupos ligantes.

Os espectros de RPE das amostras estudadas neste trabalho estão nas Figuras 32 a 5; p. 81 a 94. Os parâmetros relativos aos espectros em causa estão nas Tabelas 19 e 20.

TABELA - 19: PARÂMETROS DE EPR DE AH

Amostra	Cu^{2+}				Mn^{2+}		Fe^{3+}	
	$g_{ }$	g_{\perp}	$A_{ }$	$A_{N\perp}$	g	A	g	
AHBO	N.d	2,061	—	17,0	2,000	80,00	8,9	4,3
AHCA	N.d	2,053	—	15,0	2,000		4,3	2,2
AHCO	N.d	2,055	—	17,0	2,000		4,3	2,2
AHOV	N.d				2,000		4,3	2,2

Constantes de interação hiperfinas em unidades de 10^{-4} cm^{-1}

AH (AH não ressolubilizados).

N.d (não determinado).

TABELA - 20: PARÂMETROS DE EPR DE AHr*

Amostra	Cu^{2+}				Mn^{2+}		Fe^{3+}	
	$g_{ }$	g_{\perp}	$A_{ }$	$A_{N\perp}$	g	A	g	
AHBO	2,320	2,089	142	16,0	N.d	N.d	8,9	4,3, 2,2
AHCA	2,294	2,057	156	16,5	N.d	N.d	8,9	6,1, 4,3
AHCO	2,304	2,055	154	17,0	N.d	N.d	8,9	6,1, 4,3
AHOV	N.d	2,061	N.d	16,0	2,000	73,00	8,9	4,3, 2,2

Constantes de interação hiperfinas em unidades de 10^{-4} cm^{-1}

* AHr (AH ressolubilizados)

(Os dados de $g_{||}$, g_{\perp} , $A_{||}$ para AHr-CA e AHr-CO foram obtidos dos espectros simulados).
(para as outras amostras os valores foram obtidos dos espectros experimental).

N.d (não determinado).

Os espectros de VC (Figs. 55 a 58; p. 92 a 94) são dominados por uma linha larga de absorção, na região de $g \sim 2,00$, com largura entre 800 e 1100 Gauss, atribuída a sais de Fe^{3+} e óxidos de ferro com interações dipolares intensas. O conteúdo de Fe^{3+} com ressonância em $g \sim 4,3$ é aparentemente menor para os VC quando são comparados seus espectros com os dos AH. Como podemos ver nas Figuras 55 a 58 a linha de ressonância em $g \sim 4,3$ é bastante discreta para todos os espectros (pequena exceção para VCCA) portanto diferentemente dos AH, nas amostras de VC a maior parte do ferro deve pertencer a estruturas inorgânicas que foram eliminadas no

tratamento de extração dos AH. O VCCA apresenta as maiores intensidades das linhas em $g \sim 4,3$, bem como para o radical orgânico ($g=2,00$) (Fig. 56; p. 93).

Tanto as amostras de AH ressolubilizadas (AHr) quanto as não ressolubilizadas (AH) apresentaram absorção de radical livre orgânico em $g=2,00$ e largura de linha variando de 6,0 a 7,0 Gauss. Apresentam também linha de absorção em $g=4,3$ indicativa da presença de íons Fe^{3+} em alto spin ($S = 5/2$) em sítios octaédricos e/ou tetraédricos com distorção rômica ($E/D = 1/3$), no qual o parâmetro E é indicativo da distorção rômica e o parâmetro D, da distorção axial (CASTNER et al., 1960; AASA, 1970; SENESI, 1990; MARTIN-NETO et al., 1991; WILSON, 1994). De forma geral todas as amostras de AH apresentaram uma linha larga de absorção centrada em $g \sim 2,2$ na forma de um envelope correspondente à sobreposição de linhas do acoplamento spin-spin (interação dipolar), proporcionais a r^{-3} , (sendo r o raio da esfera das duas espécies) como já ocorria nas amostras dos VC, porém menos intensas que naqueles casos. Estas linhas largas ocorrem quando da presença de metais paramagnéticos e óxidos de ferro absorvendo na mesma região de campo como já citado acima (LAKATOS et al., 1977; SENESI, 1990; WILSON, 1994). A partir dos dados das Tabelas 15 (FTIR) e 16 (1H -RMN) e dos espectros de RPE dos AH, parece provável que a origem destas linhas largas seja devida a uma grande concentração de íons Fe^{3+} complexados com constituintes da matéria orgânica, além de óxidos de ferro (SENESI, 1990). A concentração deste metal é bem superior à concentração de outros metais analisados, para todas as amostras de AH (Tab. 15 e 16; p. 55).

Os espectros de RPE das amostras de AH de caprino e de coelho ressolubilizados exibiram ressonância em $g \sim 6,0$ a qual corresponderia ao valor de g_{\perp}

de íons Fe^{3+} de spin alto em sítios com simetria axial, muito provavelmente devido a porfirinas de Fe^{3+} (SENESI, 1990; WERTZ-BOLTON, 1972; NAKAGAKI et al., 1997). Esta região do espectro está detalhada nas Figuras 43 e 51; p.86 e 90.

Todos os espectros apresentaram estrutura típica de interação super - hiperfina do íon Cu^{2+} com 4 átomos de nitrogênios na região de campo alto (região perpendicular de espectro axial do Cu^{2+}). Estas interações estão melhor definidas nas ampliações dos espectros, mostrados nas Figs. 33, 35, 37, 39, 45, 47 e 54; p. 81, 82, 83, 84, 87, 88 e 92. E suas simulações nas Figs. 40, 41, 42, 48, 49, 50; p. 85, 86, 88, 89 e 90. Como podemos ver nestas Figuras, existem 9 linhas cujas distâncias entre elas variam de 15 a 17 Gauss, conforme valores das Tabelas 19 e 20, p. 76. O número de linhas super-hiperfinas é dado pela fórmula $2nI+1$, onde n , no caso, é o número de átomos magneticamente equivalentes ligados ao íon central Cu^{2+} e I é o valor do spin nuclear desses átomos de nitrogênio (WILSON, 1994). Podemos ver que todos os espectros apresentam 9 linhas de interação super - hiperfinas, com exceção dos espectros de AHBO (Fig. 33) e AHCA (Fig. 37) (oito linhas cada) e AHr-OV (Fig. 39) também com oito linhas. Não foi possível atribuir a 9ª linha nestes espectros devido a não resolução desta, mesmo após a ampliação e obtenção de 2ª derivada dos espectros nesta região. Contudo, é de se esperar que o íon Cu^{2+} esteja complexado com 4 nitrogênios, pois a fórmula $2nI+1$ fornece apenas número ímpar de linhas quando o spin nuclear é ímpar, como no caso do nitrogênio de massa 14, ($I = 1$). Poder-se-ia atribuir a algumas das oito linhas destes espectros como sendo da interação perpendicular hiperfina do Cu^{2+} , A_{\perp} . A magnitude de A_{\perp} varia de 25 a 30 Gauss para complexos de cobre - porfirina, os quais estão sendo propostos neste

trabalho, fundamentado nos parâmetros espectroscópicos das Tabelas 19 e 20. Em nenhum dos espectros de AH foram encontradas linhas na região perpendicular do Cu^{2+} , com magnitude acima de 17 Gauss, a não ser que as interações hiperfinas perpendiculares do cobre, correspondam as distâncias entre linhas intercaladas por uma linha de interação super - hiperfina com o nitrogênio. Embora todos os espectros de AH tenham apresentado interações super-hiperfinas características de complexos Cu-porfirina nos espectros nos quais foi possível determinar $A_{//}$, estes apresentaram magnitude típica de complexos de cobre com 4 oxigênios (SENESI et al., 1985; BOYD et al., 1981), com variação entre 142 a 156 Gauss, como podemos ver na Tabela 19; p. 76.

No entanto valores das interações super-hiperfinas, 15 a 17 Gauss, e número de linhas identificadas nas regiões perpendicular do espectro de Cu^{2+} , são consistentes com valores encontrados na literatura para complexos de cobre - porfirina (KURSTAN et al., 1997). Os espectros de AHr-CA e AHr-CO foram simulados no programa de simulação Simfonia®, da Bruker, a partir da premissa de que os espectros experimentais sejam a soma de espectros de complexos Cu-4O e Cu-4N (Figs. 42 e 50). Esta hipótese é reforçada pelas atribuições aos espectros de FTIR nos quais podemos identificar bandas de interação de carboxilatos com metais, vibração assimétrica de COO^- em 1651 a 1635 cm^{-1} (Tabela 15; p. 63) e dados de ^1H -RMN, (Tabela 16; p. 66), na qual encontramos atribuições de grupos heterocíclicos aromáticos nitrogenados. Os valores de $g_{//}$, $A_{//}$ e g_{\perp} foram resultados das simulações mostradas nas Figuras 40, 41, 48 e 49; p. 85 e 89. Para os demais AH estes parâmetros foram determinados nos espectros experimentais. Os valores de $g_{//}$ e $A_{//}$,

típicos de coordenação de um íon Cu^{2+} com 4 oxigênio (STEPHEN et al., 1981) são mais evidentes no espectro experimental, como obtido também por simulação. Isto nos leva a hipótese de que a concentração de complexos de Cu-4O seja mais abundante, sobressaindo desta forma a região do espectro paralelo de interação hiperfina destes complexos sobre os complexos de Cu-porfirina.

Os complexos de Cu-4N foram simulados com valores de $A_{//}$, típicos destes complexos, os quais variam de 180 a 200 Gauss (KURSTAN et al., 1997). Como podemos ver na Tabela 19 (p. 76) os valores $g_{//} > g_{\perp} > 2,0$, indicam que o elétron desemparelhado, na configuração d^9 , ocupa o orbital $d_x^2 - d_y^2$, no plano de simetria tetragonal alongada (CALVO et al., 1990; DISMUKES, 1987). Para os espectros de AH (Não ressolubilizados (Tabela 19; p. 76), não foi possível determinar os valores de g e A paralelos.

Os espectros de RPE de AHBO, AHr-BO, AHr-CO e AHr-OV, apresentam linhas de absorção típicas de complexos de íon Mn^{2+} em esfera externa $[\text{Mn}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$ - AH, $A \sim 80$ Gauss, complexo com razoável caráter iônico, (Figs. 33, 35, 47 e 54; p. 81, 82, 88 e 92).

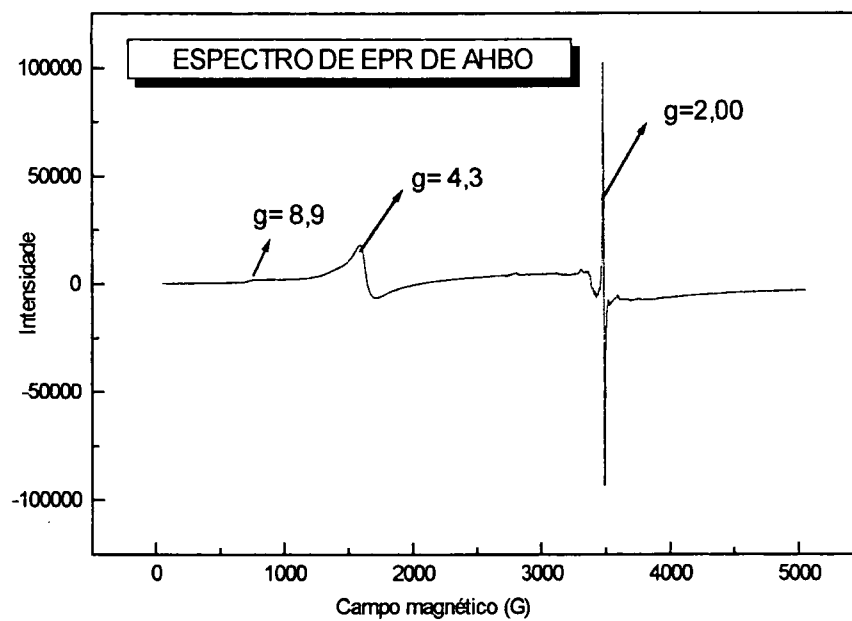


Figura 32: Espectro de RPE de AHBO.

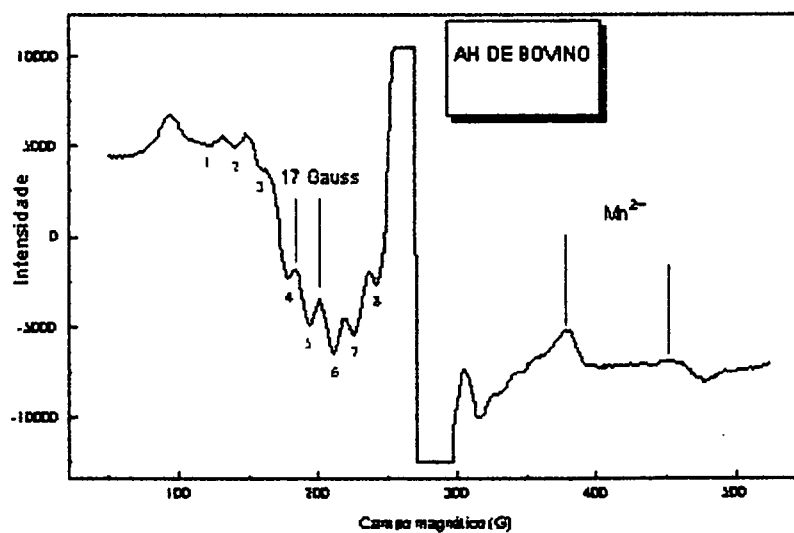


Figura 33: ESPECTRO DE RPE DE AHBO (Detalhe das linhas de Cu e Mn).

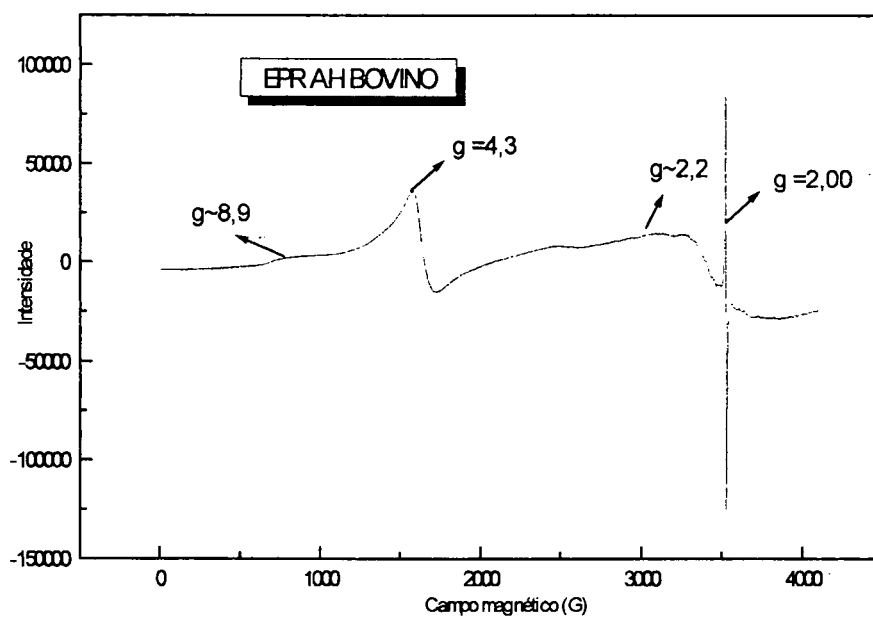


FIGURA 34: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-BO.

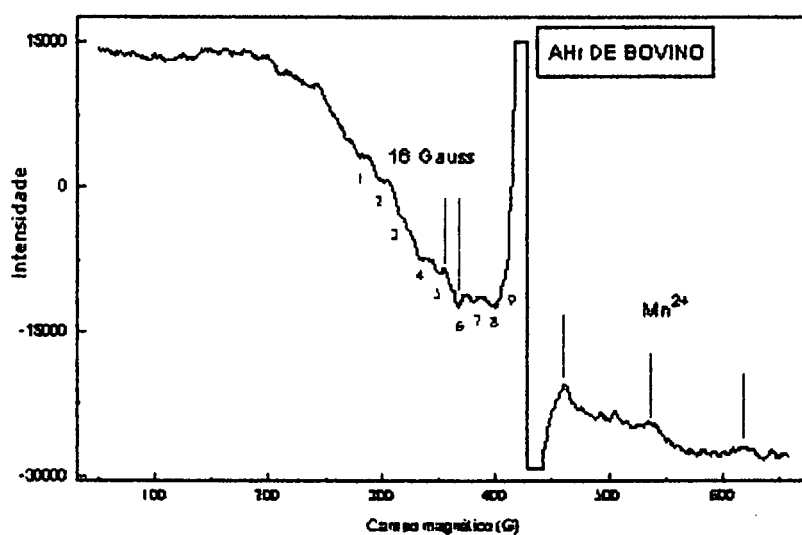


FIGURA 35: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-BO (Detalhe das linhas do Cu e Mn).

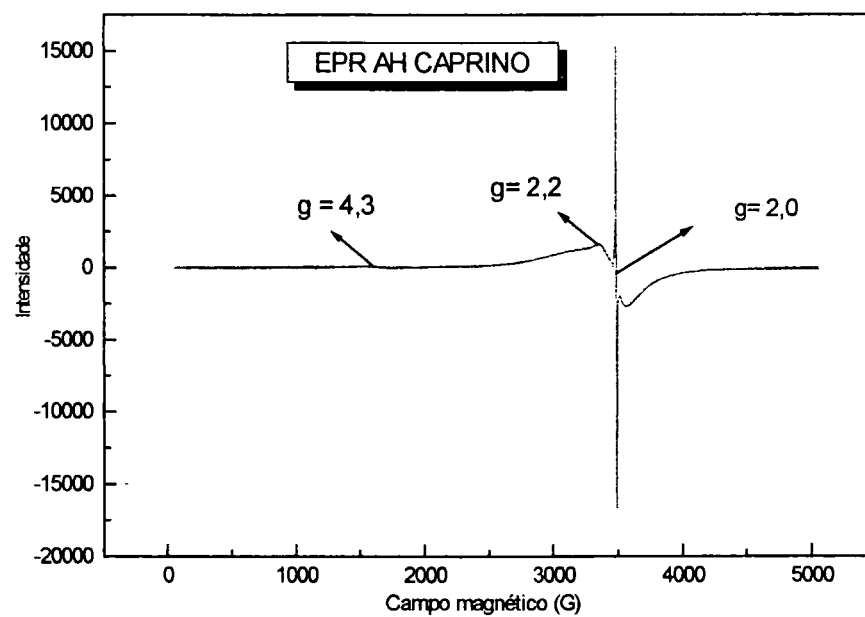


FIGURA 36: ESPECTRO DE RPE DE AHCA.

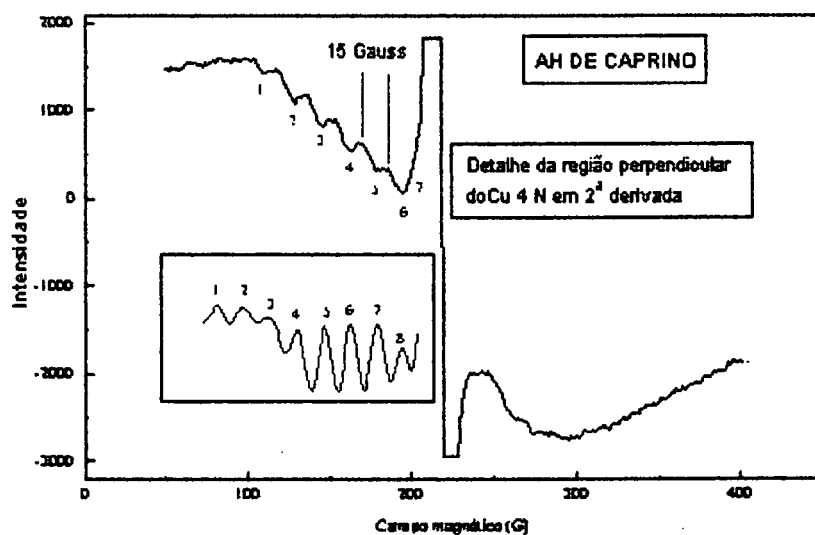


FIGURA 37: ESPECTRO DE RPE DE AHCA (Detalhe das linhas do Cu).

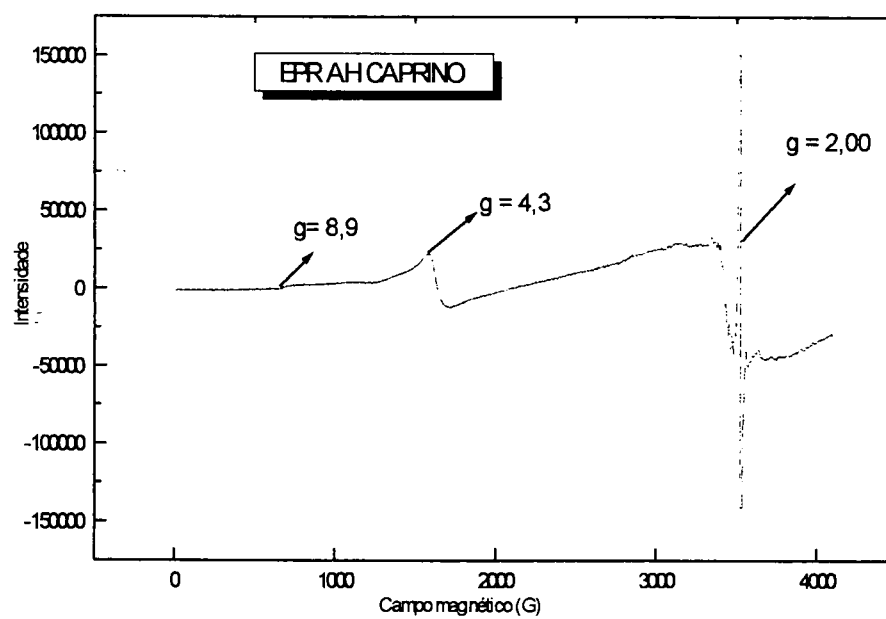


FIGURA 38: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CA.

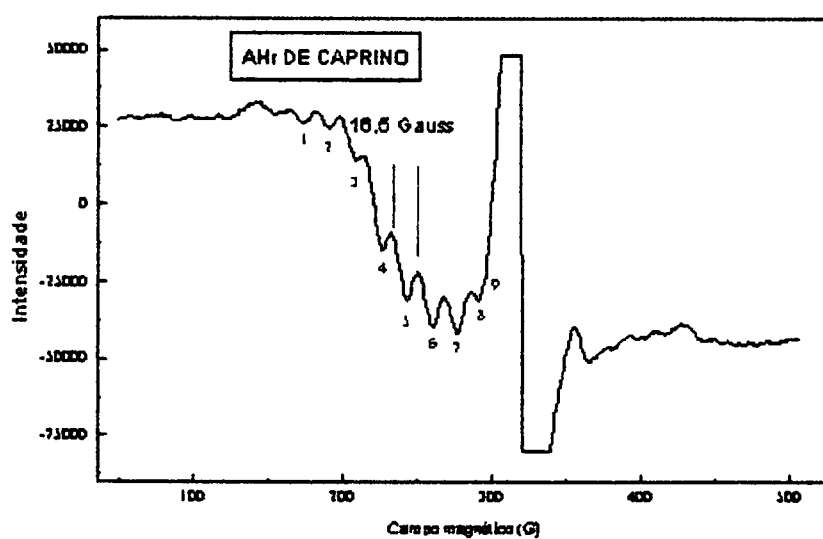


FIGURA 39: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CA (Detalhe das linhas do Cu).

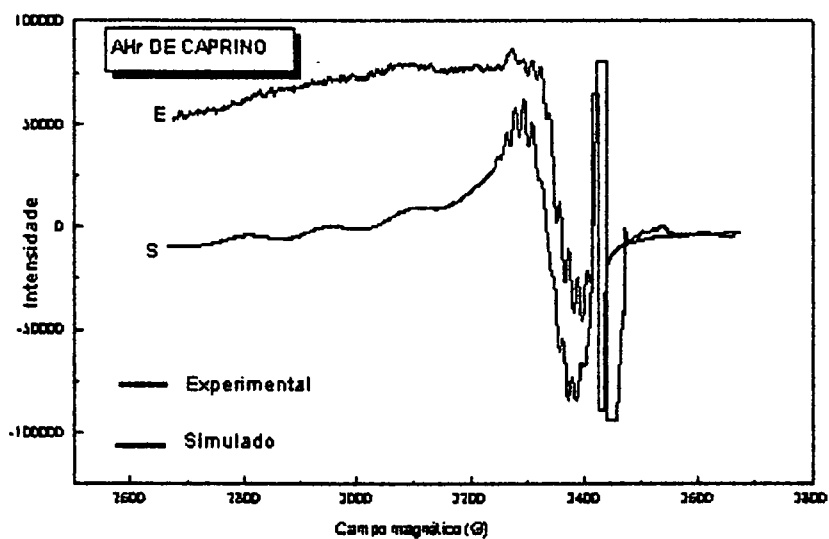


FIGURA 40: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CA (Experimental e simulado).

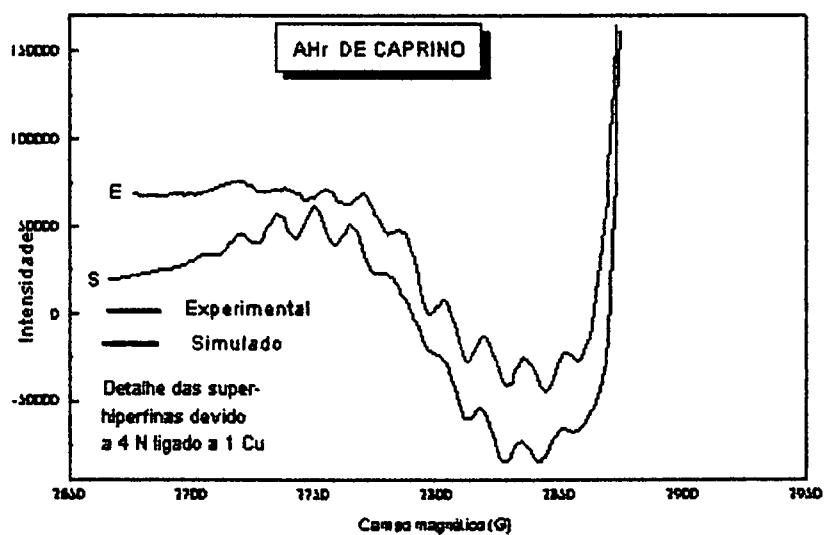


FIGURA 41: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CA (super-hiperfina Cu-4N).

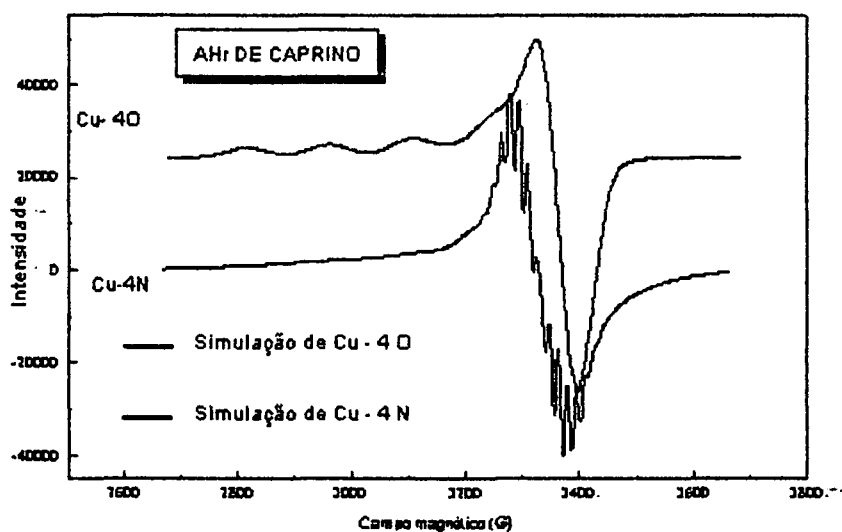


FIGURA 42: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CA (Simulação Cu-4N e Cu-4O).

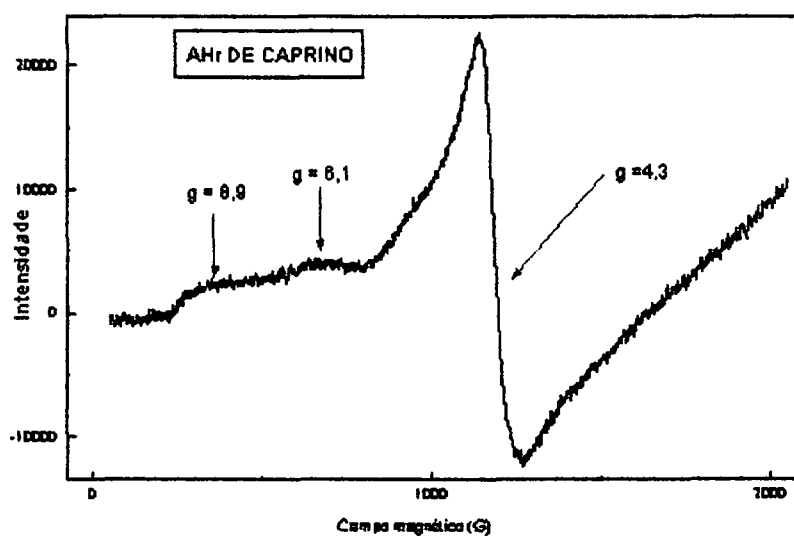


FIGURA 43: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CA (região do $g_{\perp} = 6,0$ de Fe^{3+} - Porfirina).

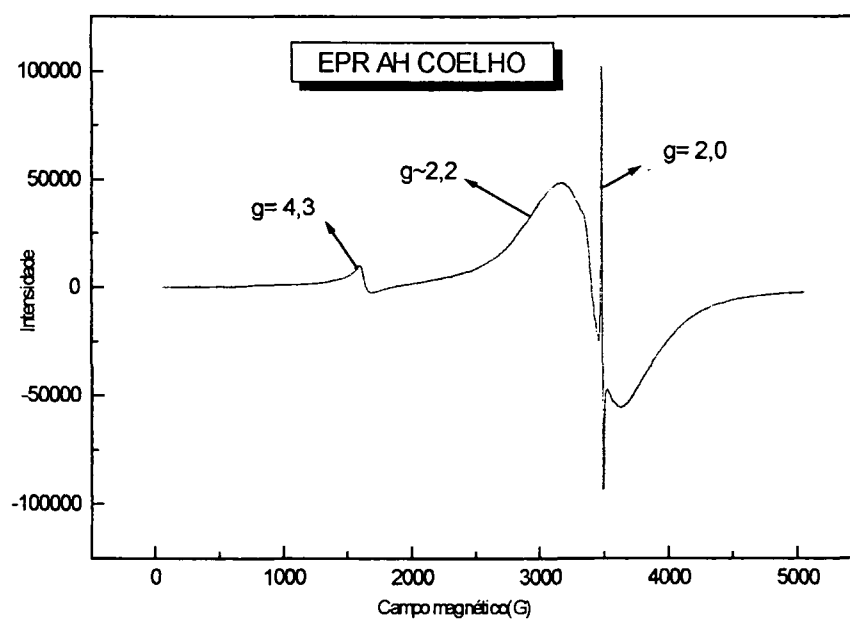


FIGURA 44: ESPECTRO DE RPE DE AHCO.

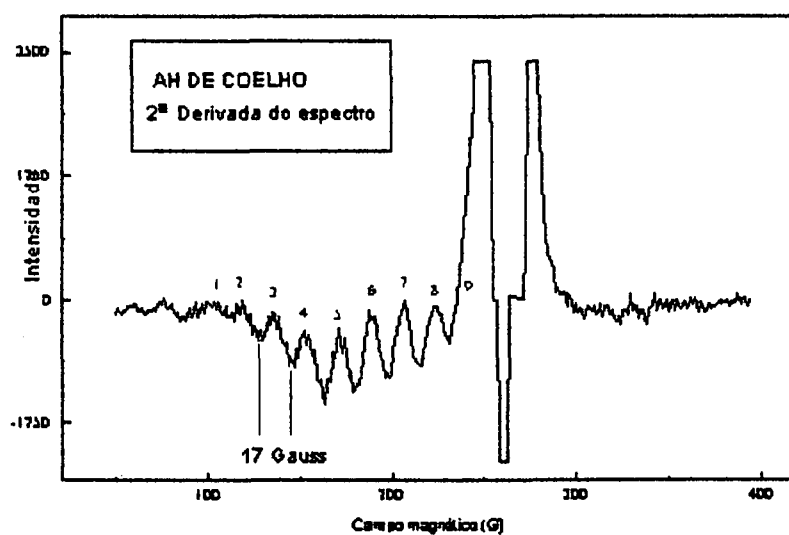


FIGURA 45: ESPECTRO DE RPE DE AHCO (Detalhe das linhas do Cu 2ª derivada).

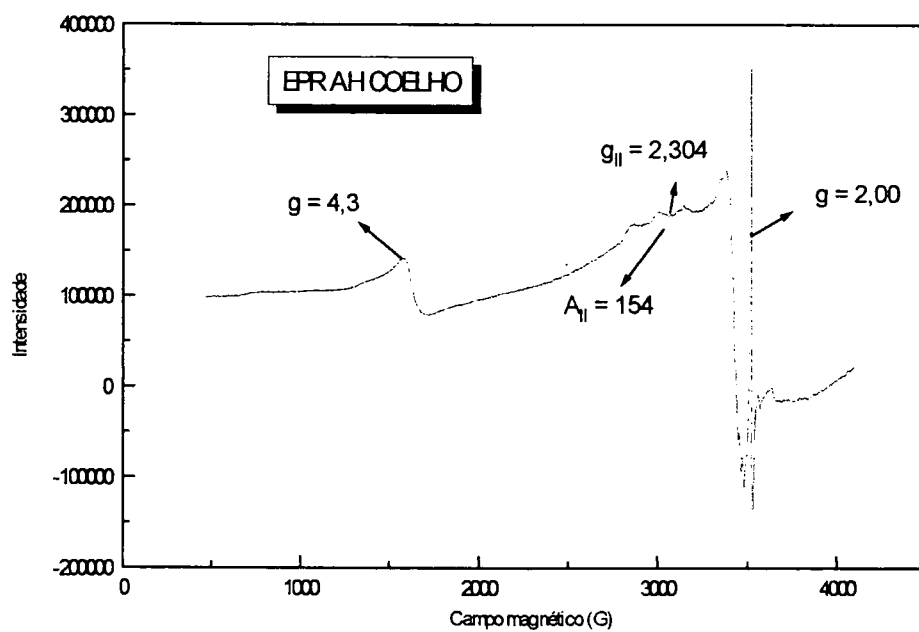


FIGURA 46: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CO.

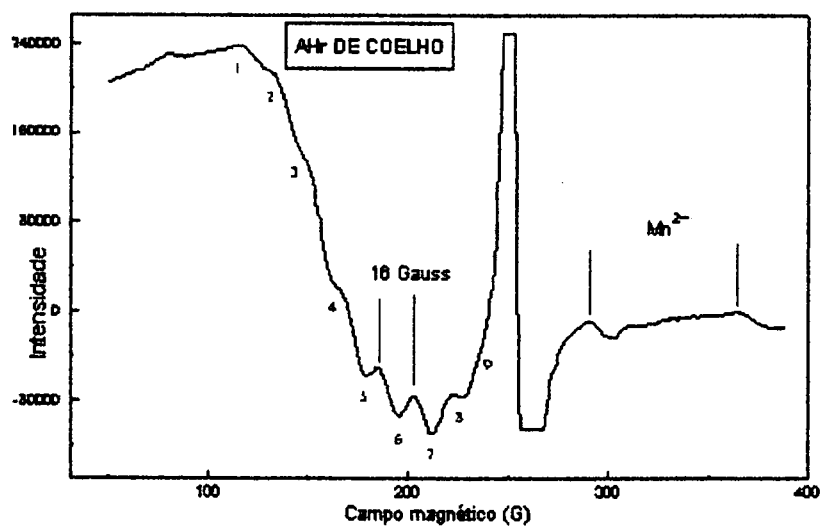


FIGURA 47: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CO (Detalhe das linhas do Cu e do Mn).

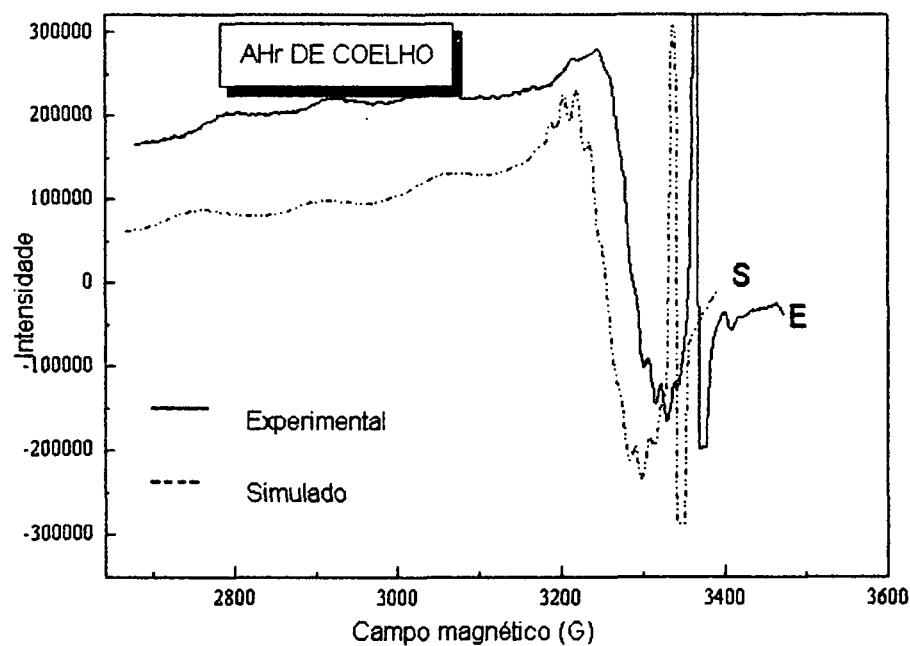


FIGURA 48: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CO (Experimental e simulado).

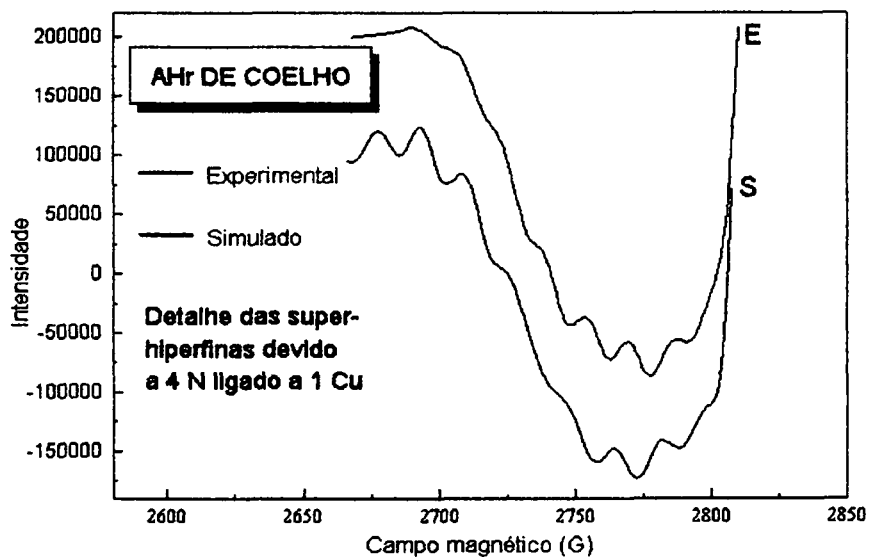


FIGURA 49: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CO (Super - hiperfina Cu- 4N).

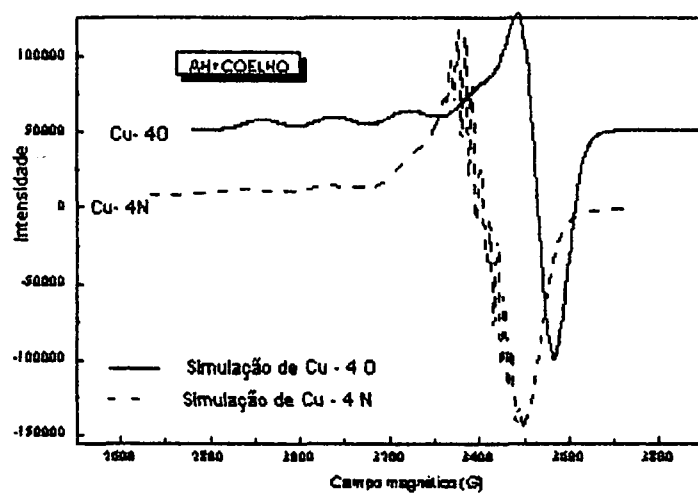


FIGURA 50: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CO (Simulação Cu-4N e CU-4O).

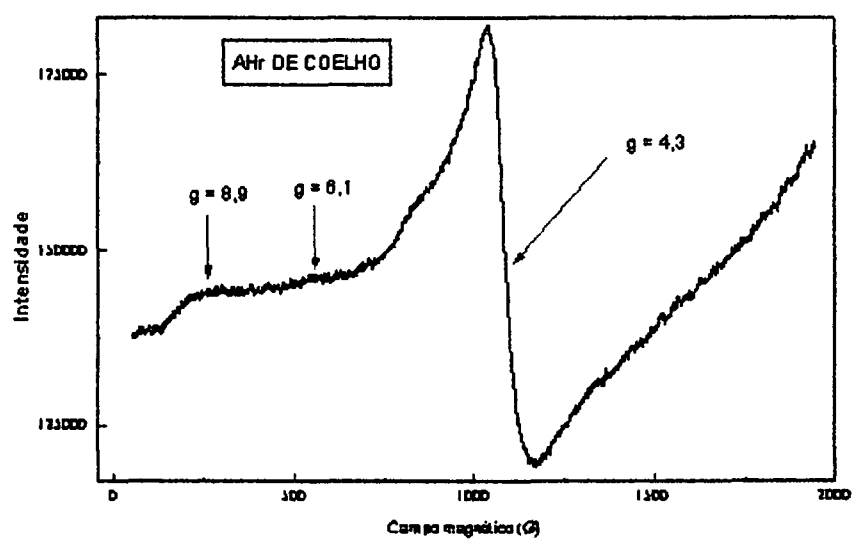


FIGURA 51: ESPECTRO DE RPE DE Ahr-CO (região do $g_{\perp} = 6,0$ de Fe^{+3} -Porfirina).

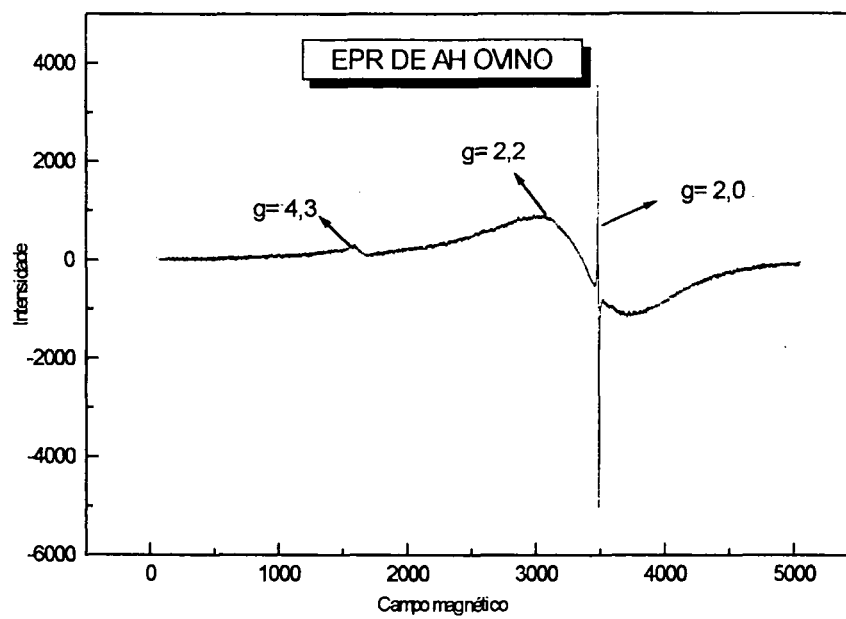


FIGURA 52: ESPECTRO DE RPE DE AHOV.

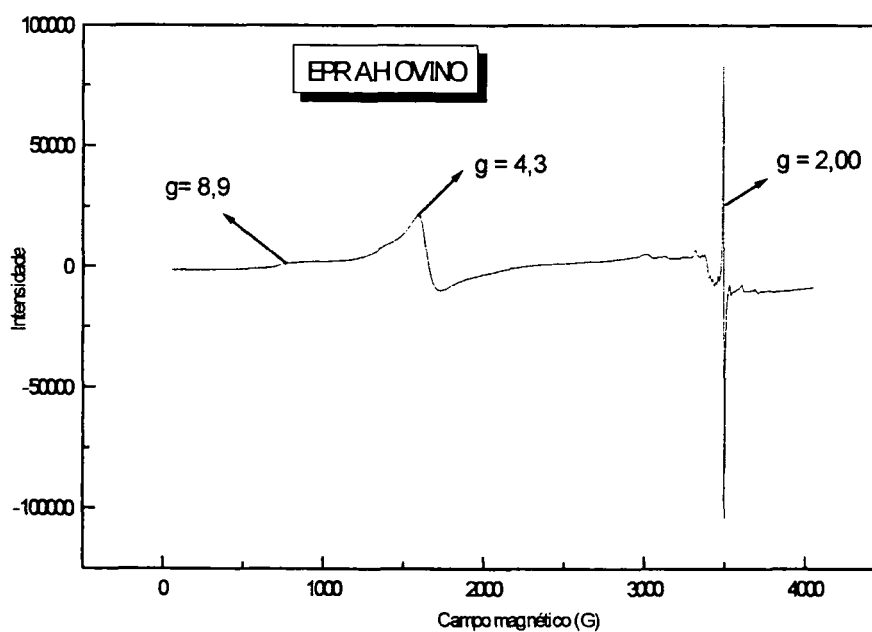


FIGURA 53: ESPECTRO DE RPE DE AHr-OV.

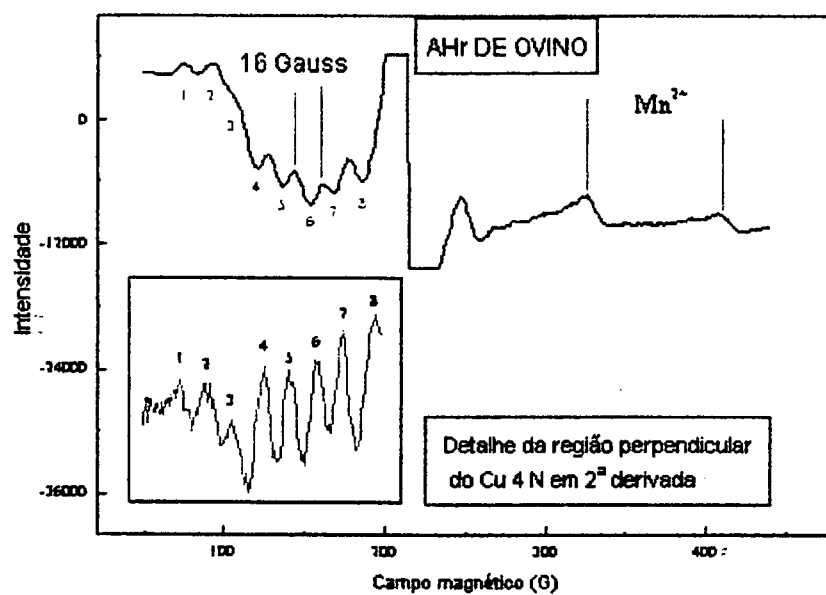


FIGURA 54: ESPECTRO DE RPE DE AHr-OV (Detalhe das linhas do Cu e do Mn).

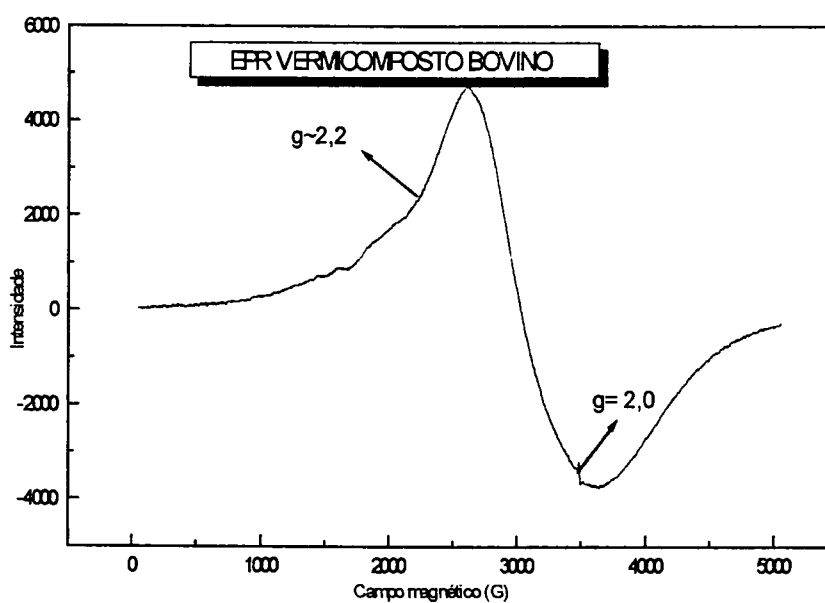


FIGURA 55: ESPECTRO DE RPE DE VCBO.

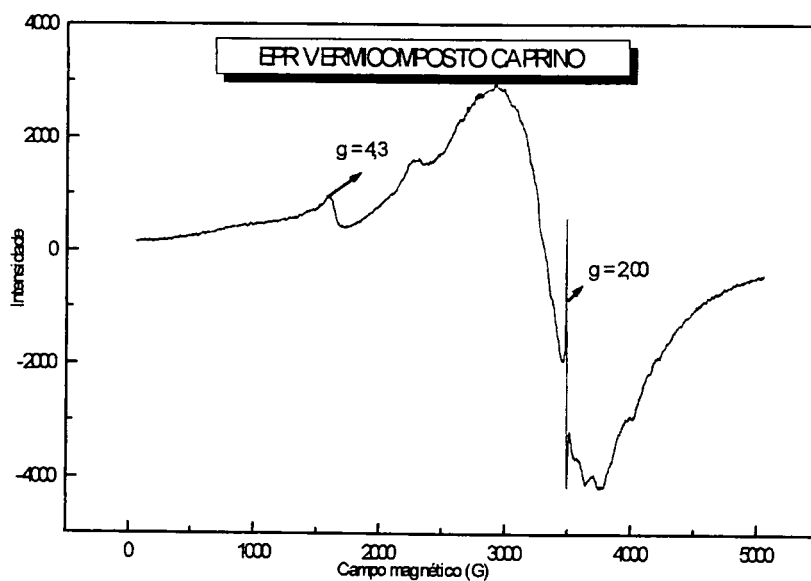


FIGURA 56: ESPECTRO DE RPE DE VCCA.

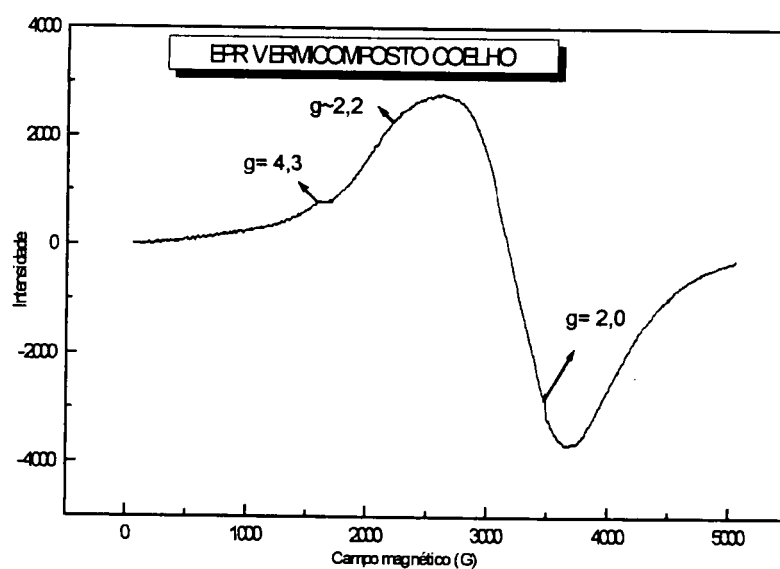


FIGURA 57: ESPECTRO DE RPE DE VCCO.

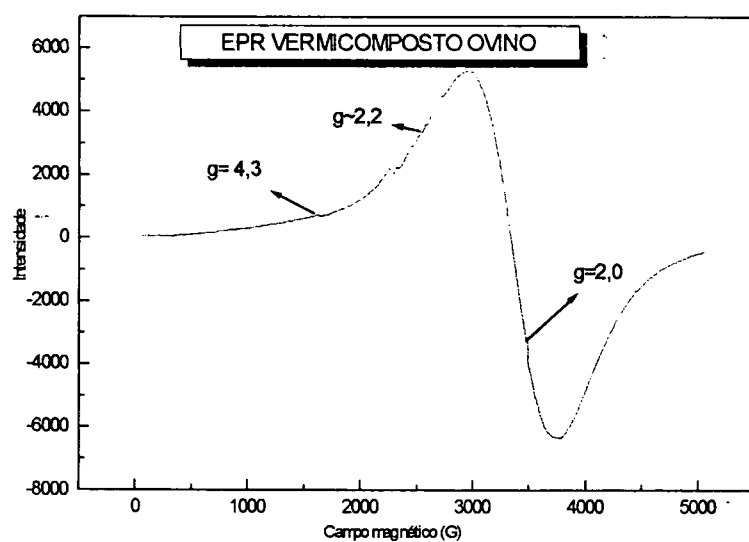


FIGURA 58: ESPECTRO DE RPE DE VCOV.

5.- CONCLUSÕES

Os estudos combinados das análises químicas, térmicas, e espectroscópicas levam às seguintes conclusões:

5.1- Com base nos valores da razão E_4/E_6 , razão H/C e ^1H -RMN foi deduzido que as amostras analisadas são constituídas por grupos alquil aromáticos com alto grau de condensação e/ou conjugação;

5.2- Foi indicado pela da análise elementar elevado teor de nitrogênio nas amostras analisadas; este nitrogênio pode estar fazendo parte de ligações peptídicas, como foi determinado por ^1H -RMN e FTIR, assim como heterocíclicos nitrogenados como foi deduzido por análise térmica e detectada por ^1H -RMN e reforçada por RPE (Possivelmente parte do nitrogênio esteja fazendo parte de complexos porfirínicos).

5.3- As amostras de AH e VC possuem baixa acidez carboxílica e elevada acidez fenólica, determinadas por análise química e confirmada por espectroscopia de FTIR, ^1H -RMN, E_4/E_6 ; estes valores baixos podem indicar baixo grau de humificação destas amostras.

5.4- A determinação de grupos difenólicos orto/para foi feito através da adaptação de métodos descritos na literatura (HELBURN et al., 1994) com a vantagem de diminuir o

tempo necessário para a determinação do mesmo, e também por fornecer novos parâmetros para se estudar as SH.

5.5- Grande parte dos grupos difenólicos estão em posição orto/para, sobretudo no caso de AHCA. Nesta amostra a presença de grupos orto e para difenóis é confirmada por ^1H -RMN.

5.6- A presença de íons metálicos micronutrientes nestas amostras foi determinadas por absorção atômica; Mn; Fe; Co e Cu encontram-se em quantidades razoáveis, de forma à serem absorvidos pelas plantas.

5.7- A espectroscopia de RPE forneceu informações sobre alguma das formas nas quais esses íons metálicos encontram-se nas amostras estudadas: o íon Mn^{2+} sob forma de complexo de esfera externa $[\text{Mn}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$; o íon Fe^{3+} em sítios tetraédricos e/ou octaédricos com distorção rômbrica; e no caso dos AHR-CA e AHR-CO em simetria axial provavelmente formando complexos de porfirinas de ferro;

5.8- No caso do Cu^{2+} os espectros de RPE mostram que o mesmo apresenta-se sob duas formas: uma mais disponível para as plantas na forma de complexos de Cobre ligados a grupos oxigenados e outra menos disponível para as plantas sob forma de complexos de cobre - porfirina.

5.9 - O estudo conjunto das técnicas aplicadas revelou que os AH e VC tem características estruturais análogas, variando o caráter aromático, os teores de grupos funcionais, e de íons metálicos micronutrientes entre elas

5.10- Como conclusão final pode-se dizer que através da caracterização criteriosa é possível sugerir o vermicomposto adequado para processos de fertilização de solos pobres e degradados, em função das deficiências específicas do mesmo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABDUL-HALIM, A. L. et al. An EPR Spectroscopic Examination of Heavy Metals in Humic and Fulvic Acid Soil Fractions. **Geochim Cosmochim. Acta**, v. 45, p. 481-487, 1981.
- 2 ALBANELLI, E.; PLAIXATS, J.; CABRERO, T. Chemical Changes During Vermicomposting (*Eisenia Foetida*) of Sheep manure mixed with cotton industrial wastes. **Biol. Fertil. Soils**, v. 6, p. 266-269, 1988.
- 3 ALBERTS, J. J.; SCHINDLER, J. E.; MILLER, R.W. Elemental mercury evolution mediated by humic acid. **Science**, v. 184, p. 895, 1974.
- 4 ANDERSON, H. A., et al. Humic substances of surface waters litter and soil throughflow relationships in two forested ecosystems. **Anal Chim Acta**, v. 232, p. 3-10, 1990.
- 5 ANDRIGUETTO, J. M., et al. **Nutrição Animal - As bases e os fundamentos da nutrição animal**. Os alimentos. São Paulo, Nobel. 1985, v. 1 395 p.
- 6 _____ **Nutrição Animal - Alimentação animal** (nutrição animal aplicada) São Paulo, Nobel. 1985, v. 2 425 p.
- 7 AQUINO NETO, F.R.; MANGRICH, A.S. A versatile system for quantitative gas analysis by GC. **Sci. Chromatographic. J.**, v.21, p. 541, 1983.
- 8 AASA, R. Power line shapes in the electron paramagnetic resonance spectra of high spin ferric complex. **Chem Phys. J** v. 52, p. 3919-3930, 1970.
- 9 AYUSO, M., HERNÁNDEZ, T., GARCIA, C. Effect of humic fractions from urban wastes and other more evolved organic materials on seed germination. **Sci Food Agric. J.**, v. 72, p. 461-468, 1996.
- 10 BOHLEN, P.J.; EDWARDS, C.A; Earthworm effects on N dynamics and soil respiration in microcosms receiving organic and inorganic nutrients. **Soil Biol. Biochem**, v.27, p. 341-348, 1995.
- 11 BONDIETTI, E.; MARTIN, J.P; and HAIDER, K. Stabilization of amino sugar units in Humic-type polymers. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v. 36, p. 597- 602, 1992

- 12 BOYD, S. A, et al., The mechanism of copper (II) binding by humic acid: an electron spin resonance study of a copper (II)-humic acid complex and adducts with nitrogens donors. **Soil Sci. Soc. Am. Proc** v. 45, p. 745-749, 1981
- 13 BRADY, N. C. **Natureza e propriedades dos solos**, Rio de Janeiro, Freitas Bastos, 1983.
- 14 BRAVARD, S., and RIGHI, D. Characterization of fulvic and humic acids from oxisol-spodosol toposequence ao Amazonia. Brazil **Geoderma**, v. 148, p. 151-162, 1991.
- 15 BUCHANAN, S. K., DISMUKES, G. C. Substitution of Cu^{2+} in the reaction center diquinone acceptor complex of rhodobacter sphaeroides: determination of the metal-ligand coordination. **Biochem.** V. 26, p. 5049-5055, 1987.
- 16 BUFFLE, J. The analytical challenge posed by fulvic and humic compounds. **Anal Chim Acta.**; v. 232, p. 1-2, 1990.
- 17 BUSINELLI, M. et al. Chemical Composition and Enzymic Activity of some Worm Cast. **Plant soil**, v. 80, p. 417-422, 1984.
- 18 CALVO, R., et al., Electron paramagnetic resonance investigation of photosynthetic reaction centers from rhodobacter sphaeroides R-26 in which Fe^{2+} was replaced by Cu^{2+} . **Biophys J.** v. 58, p. 149-165, 1990.
- 19 CASTNER, T. J. et al., Note on the paramagnetic resonance of iron in glass. **Chem. Phys. J.** v. 32, p. 668-674, 1960.
- 20 CATROUX, G.; SCHNITZER, M. Chemical, spectroscopic, and biological Characteristics of the organic matter in particle size fractions separated from an aquoll. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 51, p. 1200-1207, 1987.
- 21 CHAN. PAUL, L.S.; GRIFFITHS, D.A. The Vermicomposting of pre-treated pig manure. **Biol. Waste.** v. 24, p. 57-69, 1988.
- 22 CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios **Soil Sci. Soc. Am. j.** v. 41, p. 352-35, 1977.
- 23 CHESHIRE, M. V.; et al. Metal distribution and nature of some Cu, Mn and V complexes in humic and fulvic acid fractions of soil organic matter. **Geochim Cosmochim. Acta**, v. 41, p. 1131-1138, 1977.

- 24 CHESHIRE, M.V.; MCPHAIL, D.B. Hyperfine Splitting in the electron spin resonance solution spectra of humic substances **Soil Sci. Euro. J.**, v.47 p. 205-213, 1996.
- 25 CRESSER, M., KILLHAM, K., EDWARDS, T., **Soil chemistry and its applications**. Cambridge University Press, 1993, 192p.
- 26 CUNNINGHAM, K. L., et al., EPR spectra, luminescence data, and radiationless decay processes of copper (II) porphyrins. **Inorg. Chem.** V. 36, p.608-613, 1997.
- 27 DARWIN, C.R., **The formation of vegetable mould through the action of worms with observations on their habits**, London: John Murray, 1881, 265p.
- 28 _____. **Earthworm Ecology in cultivated soils**. In **Earthworm ecology** London: Chapman and Hale, p. 123-137, 1983
- 29 DEIANA, S. et al. Analytical and spectroscopic characterization of humic acids extracted from sewage sludge, manure, and wormcompost. **soil Sci.**, v. 150, p. 420-424, 1990.
- 30 _____. Iron (III) reduction by natural humic acids: a potentiometric and spectroscopic study. **Soil Sci. Eur. J.** v. 46, p. 103-108, 1995.
- 31 DIAS, E., ROLDÁN, A., LAX, A., ALBALADEJO, J. Formation os stable aggregates in degraded soil by amendment with urban refuse and peat. **Geoderma**, v. 63, p. 277-288, 1994
- 32 EDWARDS, C.A. and BOHLEN, P.J. **Biology and ecology of earthworms**. London: Chapman & Hall, 1996.
- 33 ELTANTAWY, I. M. The effect of heating on humic acid structure and electron spin resonance signal. **Soil Sci. Am. j.** v. 44, p. 512-514, 1980.
- 34 ERTHAL, S.M.D. et al. Synthesis of mononuclear manganese (III) and binuclear manganese (II/III) complexes with the ligand (2-hydroxybenzyl) (2-methylpyridyl) amine, Hbpa. **Biochem Inorg. J.** v. 59, p. 627, 1995.
- 35 FARIA, S. P. et al., Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. **Biol. Fert. Soils**, v. 10, p. 72-76, 1990.

- 36 FARMER, V.C., and PISANIELLO, D. L. Against an aromatic structure for soil fulvic acid. **Nature**, v. 313, p. 474-475, 1985.
- 37 FELBECK-JR. G.T. Structural hypothesis of soil humic acids. **Soil Sci.**, v.111,1, 42-48, 1971.
- 38 FERNANDES de SOUZA, J.J.; MANGRICH, A.S., VUGMAN, N. V. ESR of Irati oil shale kerogen from Paraná Basin (Brazil). **Bulletin of Magnetic Resonance**. V.5, p. 246, 1983.
- 39 GARCIA, B.; et al. Humic and Fulvic Characterization in Sediments from a contaminated tropical river. **Chem. Geology**, v. 118, p. 271-287, 1994.
- 40 GERASIMOWICZ, W. V.; BYLER, D. M. Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR Spectroscopic studies of humic acids **Soil Sci.** V.139, p 270-278, 1985.
- 41 GERKE, JORG. Aluminum Complexation by humic substances and aluminum species in the soil solution. **Geoderma**, v. 63, p. 165-175, 1994.
- 42 GESSA, C. et al., Spectroscopic characterization of extracts from humic and fulvic fractions: IR and ^1H NMR spectra. **Plant soil.**, v.75, p. 169-177, 1983.
- 43 GIUSQUIANI, P. L.; MARUCHINI, C.; and BUSINELLI, M. Chemical Properties of soil Amended with compost of urban waste. **Plant. Soil.** v.109, p. 73-78, 1988.
- 44 GOMES, R. C., Elemental functional group and infrared spectroscopic analysis of actinomycete melanins from Brazilian soils. **Biol. Fert. Soils.** v.21, p. 84-88, 1996.
- 45 GOMES, R. C., **Estudo de melaninas de actinomicetos do solo por análise química e infravermelho**. Rio de Janeiro, 1994. Tese (mestrado em microbiologia) Instituto de microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro
- 46 GONZALEZ-VILA, F.J.; LUDEMANN, H. D.; and MARTIN, F. ^{13}C -NMR structural features of soil humic acids and their methylated, hydrolyzed and extracted derivatives. **Geoderma.**, v. 31, p. 3-15, 1993.
- 47 GOODMAN, B. A.; CHESHIRE, M. V. The occurrence of copper-porphyrin complexes in soil humic acids. **Soil Sci. J.** v. 27, p. 337-347, 1976.

- 48 GOODMAN, B. A.; RAYNOR, J.B. Electron spin resonance of transition metal complexes. **Adv. Inorg. Chem. Radiochem.** v. 13, p. 135-362, 1970.
- 49 GRIFFITH, S.A.; SCHNITZER, M. Analytical characteristic of humic and fulvic acids extracted from tropical volcanic soils. **Soil Sci Soc. Am. Proc.**, v. 39, p. 861-867, 1975.
- 50 GUNTHER, H. **NMR spectroscopy basic principles concepts and application in chemistry.** . 2.ed. John Wiley.
- 51 HADAS, A.; KAUTSKY, L.; and PORTNOY, R. Mineralization of composted manures and microbial dynamics in soil as affected by long-term nitrogen management. **Soil Biol. Biochem.**, v. 28, p. 733-738, 1996
- 52 HAIDER K. and MARTIN, J. P. Humic acid type phenolic polymers from *Aspergillus Sydowi* culture medium, *Stachybotrys* ssp. Cells and autoxidized phenol mixtures. **Soil Biol. Biochem.**, v. 2, p. 145-156, 1970
- 53 HATCHER, P.G.; et al. Aromaticity of humic substances in soils. **Soil Sci. Am. J.**, v. 45, p. 1089-1094, 1981.
- 54 HATHAWAY, B. J., and BILLING, D. E. The electronic properties and stereo chemistry of mono-nuclear complexes of copper (II) ion. **Coordin. Chem.** V. 5, p. 143-207, 1970.
- 55 HELBURN, R. S., MACCARTHY, P., and ROBIN, S. Determination of some redox properties of humic acid by alkaline ferricyanide titration. **Anal Chim. Acta**, v. 295, p. 263-272, 1994.
- 56 JACKSON, T. A.; Humic matter in natural waters and sediments. **Soil Sci.**, 119, p. 56-64, 1975.
- 57 JORDÃO, C.P. et al., Adsorção de cátions metálicos em ácidos húmicos de latossolo, **Química nova**. V. 16, p. 517-520, 1993.
- 58 KENNETH, M., HOLTZCLAW, SPOSITO, G. Analytical properties of the soluble, metal-complexing fractions in sludge-soil mixtures: IV. Determination of carboxyl groups in fulvic acid. **Soil Sci Soc. Am. Proc. J.**, v. 43, p.318-323, 1979.
- 59 KERNDORFF, H.; SCHNITZER, M. Sorption of metals on humic acid. **Geochim. Cosmochim. Acta**, v. 44, p. 1701-1708, 1980.

- 60 KHALAF, K. J., MACCARTHY, P and GILBERT, T.W. Applications of thermometric titration's to the study of soil organic matter-II humic acids **Geoderma**, v. 14, p. 331-340, 1975.
- 61 KIEHL, E. J. **Fertilizantes Orgânicos**. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 1985, p.492
- 62 KONONOVA, M. M. **Soil organic matter**. 2.ed. London: Pergamon press, 1966. p. 544.
- 63 LAKATOS, B.; TIBAI, T., MEISEL, J. EPR spectra of humic acids and their metal complexes. **Geoderma**, v. 19, p. 319-338, 1977.
- 64 LAMIN, S.S.M. et al. Caracterização química e físico-química de vermicomposto de esterco bovino e avaliação da adsorção competitiva por cádmio e chumbo. **Química Nova**, v. 19, p. 457-463, 1996.
- 65 LEINWEBER, P.; SCULTEN, H. R.; KORSCHENS, M. Seasonal variations of soil organic matter in long-term agricultural experiment. **Plant soil**, v. 160, p. 225- 235, 1994.
- 66 LEVY, N. M.; et al. Synthesis and characterization of a binuclear iron- μ -peroxo complex of a tetraaza macrocyclic ligand. **Transit. Met. Chem**, v.186, p. 813, 1993.
- 67 MABBS, F. E. Some aspects of the electron paramagnetic resonance spectroscopy of *d*- transition metal compounds. **Chem. Soc. Reviews**. v. 2, p. 313-324, 1993.
- 68 MACBRIDIDE .M. B. Transition metal binding in humic acids: An ESR study. **Soil Sci.**, v.126, p. 200-209, 1978.
- 69 _____, Electron spin resonance investigation of Mn^{+2} Complexation in natural and synthetic molecules and soil organics. **soil Sci. Am. j**, v. 46, p. 1137-1143, 1982c.
- 70 MACBRIDE, M., KUNG, K. H . Complexation of glyphosate and related with iron (III). **Soil Sci. Soc. Am. J**, v. 53, p. 1668-1673, 1989.
- 71 MACCARTHY, P., CLAPP, C. E., MALCOLM, R. L., and BLOOM, P. R **Humic substances in soil and crop sciences: selected readings**. USA: Soil Sci. Agronomy. Inc. 1990.
- 72 MALCOLM, C., KILLAM, K., and EDWARDS, T. **Soil chemistry and its applications**. London: Cambridge University press, 1993.

- 73 MANGRICH, A.S., **Caracterização de complexos de substâncias húmicas com VO^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}** . Rio de Janeiro, 1983. Tese (doutorado em Química) - instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 74 MANGRICH, A. S.; VUGMAN, N. V. Bonding parameters of Vanadyl ion in humic acid from Jucu River's Estuarine Region. **Sci Total Environ.** v.75, p. 235-241, 1988.
- 75 MANGRICH, A. S.; et al., Electron paramagnetic resonance and ultraviolet-visible spectroscopic evidence for copper porphyrin in actinomycetes melanins from Brazilian soils. **Biol Fert. Soil.** 1997. (Aceito para publicação).
- 76 MANGRICH, A. S.; **Ressonância Paramagnética Eletrônica no estudo da interação de íons metálicos com ligantes macromoleculares do ambiente**. Curitiba, 1993. Tese (concurso de professor titular) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.
- 77 MANGRICH, A. S. Vugman, N. V. Vanadyl ethylenediamine tetraacetate in stretched polyvinyl alcohol films - determination of orientation distribution by ESR spectroscopy. **Chem. Physic.** v.146, p. 257, 1990.
- 78 _____, Vanadyl ion (VO^{2+}) as a spectroscopic probe of metal binding to nitrohumic acid. **Fuel.** v. 69, p. 925, 1990.
- 79 MARY, L. S.; MICHAEL, C.H. Metal ion complex formation constants of some sedimentary humic acids with Zn(II), Cu(II) and Cd(II). **Geochim Cosmochim. Acta**, v. 45, p. 2393-2399, 1981.
- 80 MÉRCE MAIA, A. L. R.; **Estudo de compostos modelo de ácidos húmicos com íons metálicos Al^{+3} , Fe^{+3} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} por potenciometria**. Rio de Janeiro, 1994. Tese (Doutorado em Química)- Pontifícia Universidade Católica /Rio de Janeiro.
- 81 MÉRCE MAIA, A. L. R.; et al. Equilibria studies of the Al (III) and Fe(III) with nitrosalicylic acids - nitrohumic acid - like models. **Chem. Soc. Braz. J**, v.7, n. 2, p. 97, 1996.
- 82 _____. Potentiometric equilibrium constants for complexes of nitrosalicylic and salicylic acids and Mg(II), Mn(II), Cu(II) and Zn(II). **Chem. Soc. Braz. J**, v.7, 1-7, 1996.\

- 83 MULLER, J. P.; AND GEORGE, C. Mn^{2+} bearing kaolinites from lateritic weathering profiles: Geochemical significances. **Geochim. Cosmochim. Acta**, v. 57, p. 1029-1037, 1991. .
- 84 NAKAGAKI, S.; et al. A cationic iron (III) porphyrin encapsulated between the layered structure of MoS_2 . A new approach to the synthesis of a Fe-Mo-S system . **Inorg Chimica. Acta**, v.254, p. 213-217, 1997.
- 85 NAKAGAKI, S.; et al. Synthesis of metallotetraphenyl-porphyrin in the presence of zeolite. **Biochem Inorg. J**, v.59, p. 502, 1995.
- 86 NASCIMENTO-FILHO, A. P. **Contribuição ao estudo de substâncias tipo ácido húmico por redução degradativa com amálgama de sódio**. Rio de Janeiro, 1990, Tese (mestrado em Química), Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 87 NASCIMENTO, V.M.; ALMENDROS, G.; FERNANDES, F. M. Soil humus characteristics in virgin and cleared areas of the Paraná river basin in Brazil. **Geoderma**, v. 54, p. 137-150, 1992.
- 88 NIENMEYER, J.; CHEN, Y.; BOLLAG, J.M. Characterization of humic acids, composts, and peat by diffuse reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. **Soil Sci. Soc. Am. J**, v. 56, p. 135-140, 1992.
- 89 PAIM, S.; et al. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy .**Biol. Fert soil**, v.10, p.72-76, 1990.
- 90 PAIM, S. F. **Ocorrência de fungos produtores de substâncias húmicas. Tipo Ácidos Húmicos (melaninas) em solos Brasileiros sob vegetação de cerrado**. Rio de Janeiro, 1988. Tese (Mestrado em Microbiologia)- Instituto de Microbiologia do Rio de Janeiro.
- 91 PANDEYA, S.B. Characterization of fulvic acids extracted from wastes by potentiometric titration. **Bioresource technology**. v.39, p. 77-83, 1992.
- 92 PATRICK, G.H.; et al. The Chemical structure of highly aromatic humic acids in three volcanic ash soils as determined by dipolar dephasing NMR studies. **Geochim Cosmochim. Acta**, v. 53, p. 125-130, 1989.
- 93 _____. Aromaticity of humic substances in soils. **Soil Sci. Soc. Am. J**, v. 45, p. 1089-1094, 1981.

- 94 PEISACH, J.; et al. An analysis of the electron paramagnetic resonance spectrum of *pseudomonas oleovorans rubredoxin*. A method for determination of the ligands of ferric iron in completely rhombic. **Biol. Chem. J**, v. 246, p. 5877-5881, 1971.
- 95 PERDUE, E. M. Solution thermochemistry of humic substances-I Acid-base equilibria of humic acid. **Geochim Cosmochim. Acta**. v. 42, p. 1351-1358, 1978.
- 96 PETRUSSI, F.; et al. Characterization of organic matter from animal manures after digestion by earthworms. **Plant soil**, v. 105, p. 41-46, 1988.
- 97 PIOTROWSKI, E.G.; VALENTINE, K. M.; and PFEFFER, P.E Solid state, C^{13} gross polarization, "magic angle" Spinning, NMR spectroscopy studies of sewage sludge. **Soil Sci.** v. 137, p. 194-203, 1984.
- 98 POPPI, N. R.; TALAMONI, J. Estudo dos Ácidos Húmico e Fúlvico, extraídos de solos, por espectroscopia de infravermelho. **Química Nova**, v.15, p. 281-285, 1992.
- 99 PRESTON, C. M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: History and prospects. **Soil Sci.**, v. 161, p. 144-166, 1996
- 100 PRETSCH et al., **Tablas para la elucidacion estructural de compuestos orgânicos por métodos espctroscópicos**. Madrid Alhambra S.A.
- 101 RASHID, M. A.; **Geochemistry of marine humic compounds**. New York: Springer verlag, 1985.
- 102 _____. Absorption of Metals on Sedimentary and peat Humic Acids. **Chem. Geology**. V. 13, p. 115-123, 1974.
- 103 REUTER, J.H.; PERDUE, E. M. Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural waters. **Geochim Cosmochim. Acta**. v. 41, p. 325-334, 1977.
- 104 RICCA, G.; and SEVERINI, F. Structural investigations of humic substances by IR-FT, ^{13}C -NMR spectroscopy and comparison with a maleic oligomer of known structure. **Geoderma**, v. 58, p. 233-244, 1993.
- 105 RIFFALDI, R.; SCHNITZER, M. Electron spin resonance spectrometry of humic substances. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.** v. 36, p. 301-307, 1972.

- 106 RUGGIERO, P.; INTERESSE, F.S.; SCIACOVELLI, L.C. [^1H] and [^{13}C] NMR studies on the importance of aromatic structures in fulvic and humic acids. **Geochim Cosmochim. Acta**, v. 43, p. 1771-1175, 1979.
- 107 RUGGIERO, et al. ^1H NMR Spectra of Humic and Fulvic Acids and their Peracetic Oxidation Products. **Geochim Cosmochim. Acta**, v. 44, p. 603-609, 1980.
- 108 SAAR, R.A., WEBER, J.H. Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry. **Sci. Technol.** v.16, p. 510-517, 1982.
- 109 SCHNITZER, M., Methods of soils analysis: part 2 organic matter Characterization, chemical and microbiological properties. 2.ed. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, 1982.
- 110 SCHNITZER, M.; GUPTA, V.G. Determination of acidity in soil organic matter. **Soil Sci Soc. Am. Proc.**, v. 29, p. 274-277, 1965.
- 111 SCHNITZER, M. and KHAN, U. S., **Humic substances in the environment**. New York: Dekker, 1972.
112. _____, **Soil matter: organic**. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1978.
- 113 SCHNITZER, M.; KODAMA, H.; and RIPMEESTER. Determination of the aromaticity of humic substances by X-ray diffraction analysis. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 55, p. 745-750, 1991.
- 114 SCHNITZER, M. and PRESTON, J. C. M. Analysis of humic acids by solution and solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 50, p. 326-331, 1986.
- 115 SCHNITZER, M.; SKINNER, S.I.M. Free radicals in soil humic compounds **Soil. Sci**, v. 108, p. 383-390, 1969.
- 116 _____, Organo metallic interactions in soils: stability constants of Cu^{++} Fe^{++} and Zn^{++} fulvic acid complexes. **Soil Sci.**, v 102, p.361-365, 1966.
- 117 SCHNITZER, M.; SCHULTEN, H.R. The analysis of soil organic matter by pyrolysis-field ionization mass spectrometry. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 56, p. 1811-1817, 1992.

- 118 SCHNITZER, M., HOFFMAN, I. Thermogravimetric analysis of the salts and metal complexes of a soil fulvic acids. **Geochim Cosmochim. Acta**, v. 31, p. 7-15, 1967.
- 119 SCHULTEN, H-R.; SCHNITZER, M. Aliphatics in soil organic matter in fine-clay fractions. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 54, p. 98-105, 1990.
- 120 _____, A state of the art structural concept for humic substances. **Naturwissenschaften**, v. 80, p. 29-30, 1993.
- 121 SCHULTEN, H-R., et al. Characterization of cultivation effects on soil organic matter. **Cultivation and Humus Properties**, v. 153, p. 97-105, 1990.
- 122 SCHULTEN, H-R.; LEINWEBER, P.; SORCE, C. Composition of organic matter in particle-size fractions of a agricultural soil. **Soil Sci. J.**, v.44: 667-691, 1993.
- 123 SCHULTEN, H. R.; LEINWEBER, P. Dithionite-Citrate-Bicarbonate-extractable organic matter in particle-size fractions of a Haplaquoll. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 59, p. 1019-1027, 1995.
- 124 SCHULTEN, H. R.; and SCHNITZER, M. Structural studies on soil humic acids by Curie-Point pyrolysis-Gas chromatography/ mass spectrometry. **Soil Sci.**, v. 153, p. 205-224, 1992.
- 125 SCHULTEN H.-R., 1995b. The three-dimensional structure of humic substances and soil organic matter studied by computational chemistry. **Fresenius Anal. Chem. J.**, v. 351: 74-82, 1995b.
- 125 SENESI, N.; et al. Binding of Fe^{+3} by humic materials .**Geochim Cosmochim. Acta.**, v. 41, p. 969-976., 1977.
- 126 _____, Composted material as organic fertilizers .**Sci Total Environ.**, v. 81/82, p. 521-542, 1989.
- 127 SENESI, N., BOCIAN, D. F., SPOSITO, G. Electron spin resonance investigation of copper (II) complexation by soil fulvic acid1. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 49, p.114-119, 1985.
- 128 SENESI, N., SAIZ-JIMENEZ, C., and MIANO, T. M. Spectroscopic Characterization of metal-humic acid-like complexes of earthworm-composted organic wastes. **Sci Total Environ.**, v. 117/118 : 111-120, 1992.

- 129 SENESI, N.; SPOSITO, G. Characterization and stability of transition metal complexes of Chestnut (*castanea sativa L.*) leaf litter. **Soil Sci.**, v. 40, p. 461-472, 1989.
- 130 _____. Residual copper (II) complexes in purified soil and sewage sludge fulvic acids: Electron spin resonance study. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 48, p.1247-1253, 1984.
- 131 SENESI, N.; SPOSITO, G.; BRADFORD, G. R. Iron, copper, and manganese Complexation by forest leaf litter. **Sci. Forest.**, v. 35, p. 1040-1057, 1989.
- 132 SENESI, N.; SPOSITO, G.; MARTIN, J. P. Copper (II) and Iron (III) Complexation by Soil Humic Acids: An IR and ESR Study. **Sci Total Environ.**, v. 55, p. 351-362, 1986.
- 133 SHURYGINA, E. A. et al. Differential thermal analysis (DTA) and thermogravimetry (TG) of soil humus substances. **Geoderma**, v.6, p. 169-177, 1971.
- 134 SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 2° ed. New York: John Wiley, 1967.
- 135 SKOGERBOE, R.K.; WILSON, S. A. Reduction of ionic species of fulvic acid. **Anal. Chem.**, v. 53, p. 228-232, 1981.
- 136 SORGE, C., et al. Molecular-chemical characterization of organic matter in whole soil and particle-size fractions of a podosol by pyrolysis-field ionization mass spectrometry. **Soil Sci.**, v. 158, p. 189-193, 1994.
- 137 SOZZI, S. M. L., et al. Caracterização química e físico-química de vermicomposto de esterco bovino e avaliação da adsorção competitiva por cádmio e chumbo. **Química Nova**, v. 19, p. 457-463, 1996.
- 138 SPOSITO, G. The Chemistry of soils. New York: University Press, 1989. p. 42-64.
- 139 STEELINK, C., and TOLLIN, G. Stable free radical in soil humic acid. **Biochim Biophys. Acta**. v. 59, p. 25-34, 1962.
- 140 STEVENSON, F.J: **Biochemistry of the formation of humic substances**. In: **Humus Chemistry**. New York: John wiley, 1982. P 195-219.

- 141 STEVENSON, F.J.; KRASTANOV, S.A.; ARDAKAM, M. S. Formation constants of Cu^{+2} complexes with humic acid and fulvic acid. **Geoderma**, v. 9, p. 129-141, 1973.
- 142 STEVENSON, F.J.; and GOH, K. M. Infrared spectra of humic acids and related substances. **Geochim Cosmochim. Acta**, v. 35, p. 471-483, 1971.
- 143 STUMER, D. H.; PAYNE, J.R Investigation of Seawater and Terrestrial Humic Substances With Crabon-13 and Proton Nuclear Magnetic Resonance **Geochim Cosmochim Acta**, v. 40, p. 1109-1114, 1976.
- 144 SZILÁGYI, M. Reduction of Fe^{+3} ion by humic acid preparations. **Soil Sci**, v. 111, p. 233-245, 1971.
- 145 _____. The redox properties and the determination of the normal potential of the peat-water system. **Soil Sci**, v.115, p. 434-437, 1973.
- 146 TAVARES ,M.C.H.; et al. Estudo da Adsorção - Dessorção da trifluralina em solo e em ácido húmico. **Química Nova**,v. 19, p. 605-608, 1996.
- 147 THENG, B.K.G.; WAKE, J.R.H.; POSNER, A.M. The humic acid extracted by various reagents from a soil. II. Infra-red, visible, and ultraviolet absorption spectra. **Soil Sci. J**, v. 18, p. 349-363, 1967.
- 148 TIPPING, E., HURLEY, M.A. A unifying model of cation binding by humic substances. **Geochim Cosmochim. Acta**, 56, p. 3627-3641, 1992.
- 149 TURNER, D. R.; et al. Electrochemical studies of copper and lead compexation by fulvic acid I potentiometric measurements and critical comparison of metal binding models. **Geochim Cosmochim. Acta**, v. 50, p. 289-297, 1986.
- 150 VAN DIJK, H. cation binding of humic acids. **Geoderma**, v. 5, p. 53-67, 1971.
- 151 VAN RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Ed. Ceres Ltda. Associação brasileira para pesquisa de potassa e fosfato, São Paulo, 1991.
- 152 VAN, RAY.B., and PEECH, M. Electrochemical properties of some oxissols and alfisols of the tropics. **Soil Sci Am. Proc**, V. 36, 587-593, 1972.
- 153 VIANA, L.F.S.; MANGRICH, A. S. ESR of Vanadyl ethylenediamine tetraacetate in stretched polyvinyl alcohol films. **Bulletin of Magnetic Resonance**, v. 8, p. 211, 1986.

- 154 VUGMAN, N. V.; COELHO NETO, J. A.; MANGRICH, A. S. Quinones as model of oxygenated free radical center in humic acid. EPR measurement of hyperfine coupling constant of oxygen 17 in non-enriched p-benzosemiquinone anion radical, 10 Ampere Summer School and Symposium-Magnetic Resonance and Relaxation-New Fields and Techniques, **Proceedings**, v. 75, 1988.
- 155 WERTZ, J. E.; BOLTON, J. R. **Electron paramagnetic resonance-Elementary theory and practical applications**. Ed. McGraw-Hill Book Company, cap. 14, 1972.
- 156 WILCKEN, H.; SORGE, C.; SCHULTEN, H-R. Molecular composition and chemometric differentiation na classification of soil organic matter in podzol B-horizons. **Geoderma**, v. 76, p. 193-219, 1997.
- 157 WITTBRODT, P. R.; and PALMER, C.D. Reduction of Cr (VI) in the presence of excess soil fulvic acid. **Environ Sci. Technology**, v. 29, p. 255-263, 1994.